

Neue Mechanismen der Enzyminhibition durch molekulare Clips und Tweezers

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Peter Michael Talbiersky
aus Duisburg

Essen 2009

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2009

Referent: Prof. Dr. Thomas Schrader

Koreferent: Prof. Dr. Gebhard Haberhauer

Externer Gutachter Prof. Dr. Armin Geyer (Universität Marburg)

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Stephan Schulz

„Hiermit bestätige ich, diese Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben“.

Die vorliegende Arbeit wurde in einem Zeitraum von April 2006 bis April 2009 am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader danke ich für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit sowie für die großzügige Unterstützung mit Institutsmitteln. Des Weiteren bedanke ich mich herzlich für seine wertvollen Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Armin Geyer von der Universität Marburg danke ich für die Übernahme des externen Gutachters.

Herrn Prof. Dr. Stephan Schulz danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. Michael Kirsch vom Universitätsklinikum Essen danke ich für die stete Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei enzymkinetischen Problemstellungen, sowie für die anregende Zusammenarbeit im Rahmen der Kooperationsprojekte Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Poly-(ADP-Ribose) Polymerase. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch herzlichst bei Frau Angela Wensing bedanken, die bei der Durchführung enzymkinetischer Untersuchungen am Universitätsklinikum Essen eine große Hilfe war.

Herrn Dipl.-Ing. Heinz Bandmann und Herrn Dr. Torsten Schaller danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. Torsten Schaller für die Hilfe bei der Anfertigung von MD-Simulationen.

Frau Petra Schneider und Frau Eva Ziegler danke ich für die Messung der CD-Spektren.

Herrn Klaus Kowski und Frau Dr. Jolanta Polkowska danke ich für die Aufnahme der ITC-Kurven sowie für die Unterstützung bei technischen Problemen aller Art.

Frau Dr. Jolanta Polkowska und Frau Julia März-Berberich danke ich vor allem für die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei aufkommenden synthetischen Problemen.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern danke ich herzlich für die freundliche und entspannte Arbeitsatmosphäre, für die Unterstützung und für anregende Diskussionen.

Der Werdelmann-Stiftung danke ich für die Finanzierung des Konferenzbesuches auf der ISMSC2008 in Las Vegas mit Posterpräsentation.

Besonderer Dank gebührt meiner Ehefrau Rebecca für die liebe Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Publikationen veröffentlicht:

- P. Talbiersky, F. Bastkowski, F.-G. Klärner, T. Schrader, Molecular Clip and Tweezer Introduce New Mechanisms of Enzyme Inhibition, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130* (30), pp 9824-9828.
- Michael Kirsch, Peter Talbiersky, Jolanta Polkowska, Frank Bastkowski, Torsten Schaller, Herbert de Groot, Frank-Gerrit Klärner, Thomas Schrader, A Mechanism of Efficient G6PD Inhibition by A Molecular Clip, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48* (16), 2886-2890.
- “Multivalent Synthetic Receptors for Proteins” als Beitrag zu “Cellular and Biomolecular Recognition: Synthetic and non-Biological Molecules”, R. Jelinek (ed), *Wiley-VHC*, **2009**, 193-215.
- *U.S. Provisional Patent Application UCLAP047P*: Molecular Tweezers for the treatment of amyloid-related diseases; Inventors: Gal Bitan, Akila Shanmugam, Aleksey Lomakin, Thomas Schrader, Frank-Gerrit Klärner, Peter Talbiersky, Jolanta Polkowska, Frank Bastkowski, Sharmistha Sinha, Sally Frautschy, **2009**.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Poster auf folgenden Konferenzen präsentiert:

- *The third Joint International Symposium on Macrocyclic & Supramolecular Chemistry (III ISMSC)*, Las Vegas, 13.-18. Juli **2008**.
- *ORCHEM*, Weimar, 1.-3. September **2008**.

Weitere Veröffentlichungen:

- A. Mohr, P. Talbiersky, H.-G. Korth, R. Sustmann, D. Bläser, H. Rehage, A New Pyrene-Based Fluorescent Probe for the Determination of Critical Micelle Concentrations, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111* (45), pp 12985-12992.

1	Einleitung	1
2	Ziele der Arbeit	9
3	Definitionen und Methoden	14
3.1	Enzyme (Fermente)	14
3.2	Michaelis-Menten-Theorie	16
3.3	Arten der Enzymhemmung	21
3.3.1	Reversible Enzymhemmung	23
3.3.1.1	Ein-Substrat-Reaktionen	23
3.3.1.2	Zwei-Substrat-Reaktionen	27
3.3.2	Irreversible Enzymhemmung	27
3.3.3	Partielle Enzymhemmung	28
4	Durchführung	30
4.1	Synthese der wasserlöslichen Rezeptormoleküle 606 , 622 , 734 und 750 sowie der Modellverbindungen 406 und 422	30
4.1.1	Synthese der zentralen Benzol-„Spacereinheit“	31
4.1.2	Synthese der wasserlöslichen Phosphonat- und Phosphat-substituierten Clips 606 und 622	32
4.1.3	Synthese der wasserlöslichen Phosphonat- und Phosphat-substituierten Tweezers 734 und 750	34
4.1.4	Synthese der beiden Modellverbindungen Phosphonat- und Phosphat-substituierter Benzol-Spacer 406 und 422	38
4.2	Alkohol-Dehydrogenase (ADH)	40
4.2.1	Charakterisierung der ADH	40
4.2.2	Enzymkinetische Untersuchungen der ADH	45
4.2.2.1	Etablierung des ADH-Assays	45
4.2.2.2	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	48
4.2.2.3	Untersuchung des Ursprungs der inhibitorischen Wirksamkeit beider Inhibitor-Klassen	51
4.2.2.4	Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots	53
4.2.2.5	Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente	57
4.2.2.5.1	Durchführung der Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente	58
4.2.2.5.2	Einfluss der Komponenten Clip 606 und 622 sowie Cofaktor NAD ⁺	58
4.2.2.5.3	Einfluss der Komponenten Tweezer 750 sowie Cofaktor NAD ⁺	60

4.2.2.5.4 Einfluss der Komponenten Clip 606 und 622 sowie geeigneter Konkurrenz-Moleküle	60
4.2.2.5.5 Einfluss der Komponenten Tweezer 750 sowie geeigneter Konkurrenz-Moleküle	63
4.2.2.6 Untersuchungen mit der Circular dichroismus-Spektroskopie	67
4.2.2.6.1 Grundlagen	67
4.2.2.6.2 Durchführung der CD-spektroskopischen Untersuchungen	68
4.2.2.7 Untersuchungen mit der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese	72
4.2.2.7.1 Grundlagen	72
4.2.2.7.2 Durchführung der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese	73
4.2.2.8 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	77
4.3 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD)	78
4.3.1 Charakterisierung der G6PD	78
4.3.2 Enzymkinetische Untersuchungen der G6PD	86
4.3.2.1 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	87
4.3.2.2 Ultrafiltrationsexperiment	90
4.3.2.3 Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots bei variabler Cofaktorkonzentration	91
4.3.2.4 Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente der G6PD in Abhängigkeit der beiden bestimmenden Komponenten Clip 622 und Cofaktor NADP ⁺	94
4.3.2.5 Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots bei variabler Substratkonzentration	95
4.3.2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	97
4.3.2.7 Vergleich mit anderen Dehydrogenasen	101
4.3.2.8 Molecular Modelling	104
4.3.2.9 Aufklärung der inhibitorischen Effizienz des Tweezers 750 gegenüber der G6PD	107
4.4 Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase (PARP-1)	109
4.4.1 Charakterisierung von PARP-1	109
4.4.2 Enzymkinetische Untersuchungen von PARP-1	120
4.4.2.1 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte mit Hilfe des käuflichen PARP-1-Assay-Kits der Firma Trevigen®	120
4.4.2.2 Durchführung des PARP-1-Assay-Kits der Firma Trevigen®	123
4.4.2.3 PARP-1-Assay nach Putt und Hergenrother	126

4.4.2.4	UV/Vis-spektroskopische Bestimmung der DNA-Konzentration	127
4.4.2.5	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	128
4.4.2.6	Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der NAD ⁺ -Kalibrierungskurve	133
4.4.2.7	Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots	133
4.4.2.8	Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente	135
4.4.2.8.1	Einfluss der Komponenten Tweezer 750 und Ac-Lys-OMe	135
4.4.2.8.2	Einfluss der Komponenten Tweezer 750 und DNA	136
4.4.2.8.3	Einfluss der Komponenten Clip 622 und 2'-Deoxycytidin	138
4.4.2.9	Nicht-denaturierende Gelelektrophorese	139
4.4.2.10	Überprüfung eines synergistischen Effektes durch Kombination eines kompetitiv und nichtkompetitiv wirkenden Inhibitors	139
4.4.2.11	Experimente zur Bestimmung des potentiellen Angriffsorts des Tweezers 750	141
4.4.2.11.1	Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und dem Tweezer 750	144
4.4.2.11.2	¹ H-NMR-Experimente zur Komplexbildung des Tweezers 750 mit dem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe in Anwesenheit von Zink-Ionen	149
4.4.2.11.3	Untersuchung der DNA-Bindung durch den Tweezer 750	151
4.4.2.11.3.1	Generierung der DNA	153
4.4.2.11.3.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der DNA-Bindung durch den Tweezer 750	156
4.4.2.11.3.3	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der DNA-Bindung durch PARP-1	158
4.4.2.11.4	Ultrafiltrationsexperiment	161
4.4.2.11.5	Dialyseexperiment	163
4.4.2.11.6	Molecular Modelling	164
4.5	Modifizierung des Tweezers 750 und Clips 622 zur Optimierung ihrer inhibitorischen Effizienz und ihrer Einsatzfähigkeit als Fluoreszenzsonde in Zellkulturen	168
4.5.1	Synthese des Polymerisierfähigen Tweezers 8 und Clips 9	168
4.5.1.1	Syntheseübersicht des Tweezers 8	169
4.5.1.2	Syntheseübersicht des Clips 9	170
4.5.1.3	Komplexeigenschaften des polymerisierbaren Tweezers 8 und Clips 9	174
4.5.2	Synthese des fluoreszenzmarkierten Tweezers 29 und Clips 30	180
4.5.2.1	Syntheseübersicht des Tweezers 15	183

4.5.2.2	Syntheseübersicht des Clips 17	184
4.5.2.3	Syntheseübersicht des Tweezers 29	187
4.5.2.4	Syntheseübersicht des Clips 30	188
4.5.2.5	Komplexeigenschaften des fluoreszenzmarkierten Tweezers 29 und Clips 30	191
4.5.2.6	Synthese der Pyren-Fluoreszenzsonde 4H	193
4.5.2.7	Syntheseveruche zur Einführung der Sonde 4H in den Tweezer 750	194
5	Zusammenfassung und Ausblick	197
5.1	Neue Mechanismen der Enzymhemmung	197
5.1.1	Alkohol-Dehydrogenase (ADH)	197
5.1.2	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD)	200
5.1.3	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP-1)	202
5.2	Synthese polymerisationsfähiger und fluoreszenzmarkierter Rezeptor-moleküle	205
5.3	Ausblick	208
6	Experimenteller Teil	210
6.1	Allgemeine experimentelle Methoden	210
6.2	Übersicht der verwendeten Puffer	212
6.3	Enzymkinetische Untersuchungen	214
6.3.1	Enzymkinetische Untersuchungen im Rahmen des ADH-Projektes	214
6.3.1.1	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	214
6.3.1.2	Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots	214
6.3.1.3	Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente	215
6.3.1.4	Durchführung einer nicht-denaturierenden Gel-Elektrophorese	215
6.3.2	Enzymkinetische Untersuchungen im Rahmen des G6PD-Projektes	216
6.3.2.1	Durchführung der ITC-Experimente	216
6.3.3	Enzymkinetische Untersuchungen im Rahmen des PARP-1-Projektes	216
6.3.3.1	Durchführung des PARP-1-Assay-Kits nach Trevigen®	216
6.3.3.2	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	217
6.3.3.3	Bestimmung der NAD ⁺ -Kalibrierungskurve	218
6.3.3.4	Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots	218
6.3.3.5	Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente	218
6.3.3.5.1	Einfluss der Komponenten Tweezer 750 und Ac-Lys-OMe	218

6.3.3.5.2	Einfluss der Komponenten Tweezer 750 und DNA	219
6.3.3.5.3	Einfluss der Komponenten Clip 622 und 2'-Deoxycytidin	219
6.3.3.6	Überprüfung eines synergistischen Effekts	219
6.3.3.7	Generierung der DNA	220
6.3.3.8	Durchführung des Ultrafiltrationsexperimentes	220
6.3.3.9	Durchführung des Dialyseexperimentes	221
6.4	Bestimmung der Assoziationskonstante K_a	223
6.4.1	Bestimmung der Assoziationskonstante K_a und der Komplex-induzierten ^1H -NMR-Verschiebungen $\Delta\delta_{\text{max}}$ mittels ^1H -NMR-Titrationsexperimenten	223
6.4.2	Durchführung einer ^1H -NMR-Verdünnungstitration	224
6.4.3	Bestimmung der Assoziationskonstante K_a mittels Fluoreszenztitration	224
6.4.4	Durchführung einer spektrofluorimetrischen Titration	225
6.5	Synthese Polymerisierfähiger Tweezer und Clips	226
6.5.1	Synthese von <i>N</i> -Methacryloyl-6-aminocaprinsäure (3)	226
6.5.2	Veresterung der <i>N</i> -Methacryloyl-6-aminocaprinsäure (3) mit dem Bis-Hydroxy-Tweezer 29S zu 4a und 4b	229
6.5.3	Veresterung der <i>N</i> -Methacryloyl-6-aminocaprinsäure (3) mit dem Bis-Hydroxy-Clip 13S zu 5a und 5b	234
6.5.4	Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Tweezers 4a zu 6	239
6.5.5	Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Clips 5a zu 7	242
6.5.6	Synthese des Bis-Natriumsalzes 8	245
6.5.7	Synthese des Bis-Natriumsalzes 9	248
6.5.8	Polymerisationsversuche	251
6.5.8.1	Erster Versuch	251
6.5.8.2	Zweiter Versuch	254
6.5.8.3	Dritter Versuch	256
6.6	Synthese Fluoreszenzmarkierter Tweezer und Clips	258
6.6.1	Erste Syntheseroute	258
6.6.1.1	Veresterung des <i>Z</i> -geschützten TEG-Linkers 4L mit dem Bis-Hydroxy-Tweezer 29S unter Bildung des monosubstituierten Hydroxy-Tweezers 11a	258
6.6.1.2	Veresterung des <i>Z</i> -geschützten TEG-Linkers 4L mit dem Bis-Hydroxy-Clip 13S unter Bildung des monosubstituierten Hydroxy-Clips 12a	261
6.6.1.3	Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Tweezers 11a zu 13	264
6.6.1.4	Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Clips 12a zu 14	267

6.6.1.5	Abspaltung der Z-Schutzgruppe unter Bildung von 15	270
6.6.1.6	Versuch der Abspaltung der Z-Schutzgruppe unter Bildung von 16	273
6.6.1.7	Synthesversuche zur Einführung einer Sonde in den Tweezer 750	274
6.6.1.7.1	Einführung der Fluoreszenzsonde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) unter Bildung von 18	274
6.6.1.7.2	Einführung der Fluoreszenzsonde Dansylchlorid (19) unter Bildung von 20	275
6.6.1.7.3	Einführung der Fluoreszenzsonde Fluorescamin (21) unter Bildung von 22	276
6.6.2	Zweite Syntheseroute	277
6.6.2.1	Veresterung des Dansylmarkierten TEG-Linkers 24 mit dem Bis-Hydroxy-Tweezer 29S unter Bildung des Produktgemisches aus 25a und 25b	277
6.6.2.2	Veresterung des Dansylmarkierten TEG-Linkers 23 mit dem Bis-Hydroxy-Clip 13S unter Bildung des Produktgemisches aus 26a und 26b	282
6.6.2.3	Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Tweezers 25a zu 27	287
6.6.2.4	Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Clips 26a zu 28	290
6.6.2.5	Synthese des Bis-Natriumsalzes 29	293
6.6.2.6	Synthese des Bis-Natriumsalzes 30	296
6.6.3	Synthese der Pyren-Fluoreszenzsonde	299
6.6.3.1	Veretherung des HPTS (1H) mit Bromoethylacetat (2H) unter Bildung des Methylesters 3H	299
6.6.3.2	Hydrolyse des Methylesters 3H	302
6.6.3.3	Kupplungsversuche der Säure 4H	305
6.6.3.3.1	Erster Kupplungsversuch der Säure 4H mit 15	305
6.6.3.3.2	Zweiter Kupplungsversuch der Säure 4H mit 15	306
6.6.3.3.3	Dritter Kupplungsversuch der Säure 4H mit 15	307
6.7	Fluoreszenztitrationen	308
6.7.1	Fluoreszenztitrationen der beiden Tweezers 734 und 750 mit verschiedenen Lysin- und Arginin-Derivaten, sowie mit NAD^+ und NMNA	308
6.7.2	Fluoreszenztitrationen im Rahmen des PARP-1-Projektes	323
6.7.2.1	Überprüfung einer Komplexbildung zwischen Tweezer 750 und Benzamid (BA)	323
6.7.2.2	Überprüfung einer Komplexbildung zwischen Tweezer 750 und der DNA	325

6.7.2.3 Fluoreszenztitrationen des Tweezers 750 mit verschiedenen Übergangsmetall-Ionen, Erdalkimetal-Ionen und Alkalimetall-Ionen	327
6.7.2.4 Fluoreszenztitrationen des Clips 622 mit verschiedenen Übergangsmetall-Ionen, Erdalkimetal-Ionen und Alkalimetall-Ionen	337
6.7.3 Überprüfung der Komplexeigenschaften des Tweezers 8 und des Clips 9	346
6.7.4 Überprüfung der Komplexeigenschaften des Tweezers 29 und des Clips 30	351
6.8 ¹H-NMR-Verdünnungstitrationen	356
6.8.1 ¹ H-NMR-Verdünnungstitration des Tweezers 8 mit Ac-Lys-OMe	356
6.8.2 ¹ H-NMR-Verdünnungstitration des Clips 9 mit NAD ⁺	356
6.9 Kristallstrukturdaten	358
6.9.1 Züchtung von Einkristallen des Clips 5a	358
6.9.2 Daten zur Strukturbestimmung des Clips 5a	359
7 Literaturverzeichnis	367

3-AB	3-Aminobenzamid
Ac-Lys-OMe	<i>N</i> -Acetyllysinmethylesterhydrochlorid
Ac ₂ O	Acetanhydrid
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
A2E	<i>N</i> -Retinyl- <i>N</i> -retinyliden-ethanolamin
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
AMD	Automodifikations Domäne
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Benzamid
BER	Basenexzisionsreparatur
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Circulardichroismus
DBD	DNA-bindende Domäne
DC	2'-Deoxycytidin
DCM	Dichlormethan
DDQ	2,3-Dicyano-5,6-dichlor- <i>p</i> -benzochinon
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDA	Elektronen-Donor-Akzeptor
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGCG	(-)-Epigallocatechingallat
EPS	elektrostatische Potentialoberfläche
<i>eq</i>	<i>equivalent</i> (Äquivalent)
<i>et al.</i>	und andere (lat.: et alia)
FAD ⁺	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAS	Fettsäure-Synthase
FDH	Format-Dehydrogenase
FI	Fluoreszenzintensität

Abkürzungsverzeichnis

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FT	Fluoreszenztitration
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glucose-Dehydrogenase
G6P	Glucose-6-phosphat
G6PD	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
HCTU	(2-(6-Chloro-1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat
HOBT	<i>N</i> - Hydroxybenzotriazol
HPTS	Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonat
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSA	Human Serumalbumin
HTH	<i>Helix-Turn-Helix</i>
I	Intensität
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IDH	Isocitrat Dehydrogenase
IR	Infrarotspektroskopie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
KOH	Kaliumhydroxid
MD	Molekül Dynamik
MS	Massenspektroskopie
MW	<i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)
NaOH	Natriumhydroxid
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat
NEt ₃	Triethylamin
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i> (Kernlokalisierungssignal)
NMNA	<i>N</i> -Methylnikotinamidiodid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
O.D.	Optische Dichte
p53	humaner Tumorsuppressor

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	Poly (ADP-Ribose)-Polymere
PARG	Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase
PARP-1	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDB	Proteindatenbank
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
Schmp	Schmelzpunkt
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
<i>S</i> -NAD ⁺	Thio-Nikotinamidadenindinukleotid
<i>S</i> -NADP ⁺	Thio-Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat
THF	Tetrahydrofuran
TDP	Thiamindiphosphat
TEG	Triethylenglykol
TMEDA	Tetramethylethylendiamin
U	<i>Unit</i> (Einheit)
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett
YADH	<i>Yeast</i> Alkohol-Dehydrogenase

1 Einleitung

Die Supramolekulare Chemie stellt ein wichtiges eigenständiges Teilgebiet der Chemie dar. J.-M. Lehn gilt als ihr Begründer.^[1-5] 1987 wurden er, D. J. Cram und C. J. Pedersen für die Synthese supramolekularer Strukturen mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Seit ihren spektakulären Anfängen Ende der 60-er Jahre hat die Supramolekulare Chemie zunehmend an Bedeutung gewonnen, nicht zuletzt wegen ihres immensen Beitrags zur Aufklärung und Interpretation biologischer Phänomene.^[6] Im Gegensatz zur Molekularen Chemie, die sich mit kovalenten Bindungen zwischen Atomen beschäftigt, liegen der Supramolekularen Chemie die schwächeren nicht-kovalenten Wechselwirkungen zu Grunde, die die Bildung von Molekülassoziaten ermöglichen. Diese Assoziate können dabei völlig neue Eigenschaften entwickeln, obwohl die Individualität aller beteiligten Moleküle erhalten bleibt. Abbildung 1.1 veranschaulicht den Unterschied zwischen Molekularer Chemie und Supramolekularer Chemie.^[7]

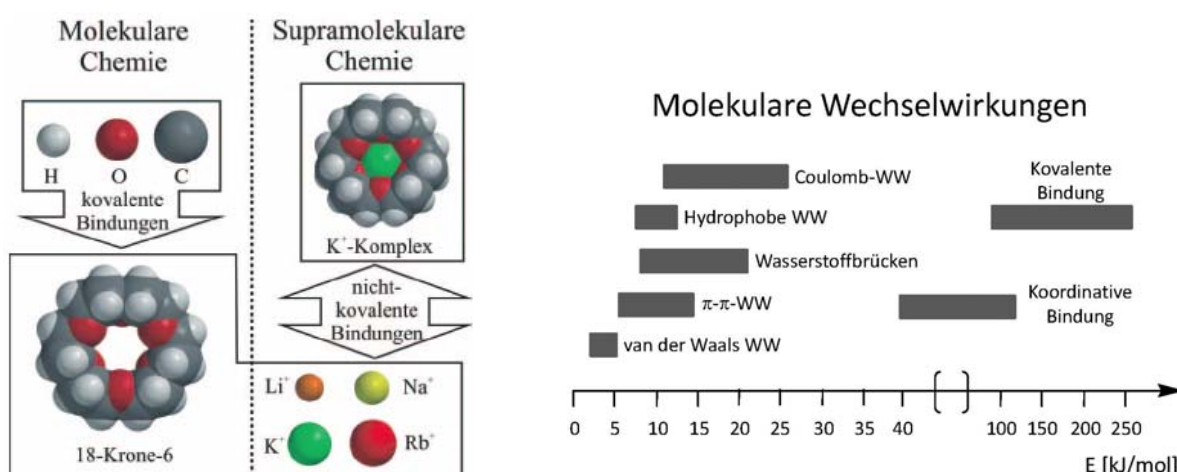


Abbildung 1.1: Links: Unterschiede der Molekularen und Supramolekularen Chemie. Rechts: Übersicht der unterschiedlichen Arten molekularer Wechselwirkungen und die dazugehörigen Energiebeträge.^[7]

Der Prozess, der zur Ausbildung dieser so genannten Über- und Superstrukturen führt, unterliegt dabei dem so genannten ubiquitärem Prinzip der molekularen Erkennung. In Kombination mit der molekularen Selbstorganisation lassen sich auf diese Weise aus einfachen Basiskomponenten komplexe supramolekulare Architekturen entwickeln.^[8-10] Vorbilder für derartige supramolekulare Systeme sind meistens natürliche, biologische Funktionsträger wie z. B. Hämoglobin als Sauerstoffträger höherer Lebewesen, Enzyme als

vielfältige biologische Katalysatoren oder Ionophore als Transporter und Signalgeber. Eine charakteristische Eigenschaft, durch die sich typische supramolekulare Verbindungen auszeichnen, besteht darin, in Hohlräumen oder Nischen definierter Abmessung und Funktion Ionen und Moleküle nach Art und Größe selektiv und reversibel zu binden, zu speichern oder zu transportieren.^[11]

Die Erkenntnisse der Supramolekularen Chemie und deren Anwendung auf den sehr wichtigen Bereich der enzymatischen Reaktionen sind letztendlich die Basis dieser Dissertation.

Die an derartigen Reaktionen beteiligten Enzyme sind Biokatalysatoren, die biochemische Reaktionen selektiv beschleunigen. Nach den wichtigsten katalysierten Reaktionen werden die Enzyme in sechs Hauptklassen eingeteilt. Man unterscheidet Oxidoreductasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen.^[12, 13] Die katalytische Wirkung eines Enzyms geschieht über ein so genanntes aktives Zentrum, das nach dem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip für die hohe Substratspezifität eines Enzyms verantwortlich ist. Die Enzyme sind unerlässlich für den Stoffwechsel von Organismen. Sie katalysieren Hunderte von aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten, durch die Nährstoffe abgebaut, chemische Energie umgewandelt und gespeichert wird und biologische Makromoleküle aus einfachen Ausgangssubstanzen aufgebaut werden. In der Medizin finden Enzyme Verwendung bei der Behandlung von Verbrennungen, Herz-, Kreislauf- und Krebserkrankungen. Die Enzymdiagnostik dient zur Diagnose verschiedener Krankheiten wie Herzinfarkt, Leber- und Bauchspeicheldrüsenentzündungen sowie Muskelerkrankungen. Biotechnologisch hergestellte Enzyme werden dagegen industriell eingesetzt. Diese werden z. B. in der Pharmazie, Lebensmittel-, Papier und Waschmittelindustrie genutzt.^[14-16] Spezielle Arzneimittel dienen ferner der Enzymhemmung (Inhibition) bzw. der Verstärkung von deren Wirkung. So hemmt z. B. die Acetylsalicylsäure das Enzym Cyclooxygenase und lindert dadurch den Schmerz.^[17]

Eine ausführliche Beschreibung der relevanten Grundlagen für enzymatische Reaktionen mit den entsprechenden Literaturziten findet sich im Kapitel 3 „Definitionen und Methoden“.

Diese Arbeit beschäftigt sich wissenschaftlich mit der Beeinflussung von Enzymaktivitäten durch künstliche Rezeptoren und deren mechanistischen Aufklärung. Als Schlüssel zu neuen Therapiemethoden ist dieses Forschungsgebiet heute weltweit von großem Interesse. Es stellt zudem ein Kerngebiet der interdisziplinären Forschung im Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen dar.

Schon seit längerer Zeit ist die medizinische Forschung bestrebt, möglichst kleine Rezeptormoleküle zu entwickeln, mit denen sich pathologische Proteinfunktionen selektiv beeinflussen lassen.^[18] Mit Hilfe der Vorkenntnisse aus röntgenspektroskopischen Protein-Untersuchungen, kombinatorischem Screening und molekularem Modelling konnten bereits zahlreiche kleine Moleküle synthetisiert werden, deren einzige Funktion darin besteht, Enzym-Inhibition durch optimale Besetzung der natürlichen Bindungsstelle, der so genannten „Active Site“, zu induzieren.^[19-23] Während der letzten Jahrzehnte hat die Supramolekulare Chemie von den natürlich stattfindenden Erkennungs-Prozessen gelernt und ein tieferes Verständnis bzgl. der Faktoren, auf die es bei der molekularen Erkennung in wässrigem Medium zu achten gilt, erlangt.^[24] Künstliche Rezeptoren sind meistens einfachere Modellsysteme, mit denen sich komplexere Zusammenhänge, wie sie z. B. in Enzymen zu finden sind, erklären lassen.^[25] Mit ihrer Hilfe lassen sich unter anderem die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Molekülen untersuchen. Die Qualität der einzelnen Rezeptoren hängt von verschiedenen Faktoren ab. Gemäß dem von Emil Fischer entwickelten „Schlüssel-Schloss“-Prinzip müssen Rezeptor und Substrat bezüglich ihrer Form, Größe und Bindungsmotiv kompatibel sein.^[26] Die Anzahl der Bindungsmotive, zu denen Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Stapel- und Kation- π -Wechselwirkungen gehören, entscheidet darüber, wie stabil der Rezeptor-Substrat-Komplex ist.^[24, 27-37] In Abbildung 1.2 sind die unterschiedlichen nicht-kovalenten Bindungsmotive am Beispiel des Alzheimer-Medikaments E2020 dargestellt, die dem entsprechenden Wirt-Gast-Komplex Stabilität verleihen.^[38-43]

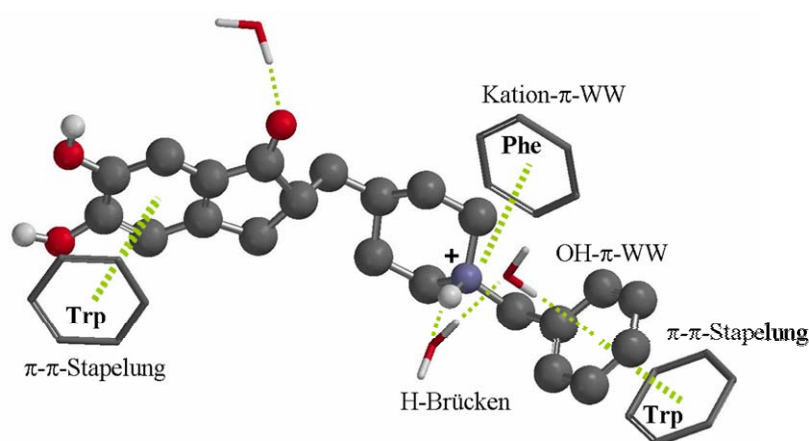


Abbildung 1.2: Übersicht nicht-kovalenter Bindungsmotive, die für die Stabilität des Wirt-Gast-Komplexes entscheidend sind, veranschaulicht anhand des Beispiels des Alzheimer-Medikaments E2020 in der „Active Site“ der Acetylcholinesterase (aus *Torpedo Californica*), PDB-Code: 1EVE.

Ein weiteres wichtiges Kriterium, das ein guter Rezeptor erfüllen muss, ist seine Präorganisation. Beispiele für derartige gut präorganisierte Rezeptoren sind z. B. Kronenether, Kryptanden, Cyclodextrine, Cyclophane, Cucurbiturile und Kryptophane.^[6, 44-58] Auch die in Abbildung 1.3 dargestellten Coffeinrezeptoren von Chen und Whitlock zeigen, wie wichtig eine gute Präorganisation des Rezeptors für die Komplexbildung ist.^[59] So wird z. B. das Substrat 1,3-Dihydroxynaphthalin-2-carbonsäure **3A** durch den Coffeinrezeptor **1A** mit rigider Spacereinheit um eine Zehnerpotenz stärker gebunden ($K_a = 10^4 \text{ M}^{-1}$) als durch den Coffeinrezeptor **2A** mit flexibler Spacereinheit ($K_a = 10^3 \text{ M}^{-1}$). Aufgrund ihrer Funktionsweise wurde hier zum ersten Mal für diese beiden Rezeptoren der Begriff molekulare Pinzette bzw. molekularer Tweezer geprägt. Die von Zimmermann *et al.* entwickelten Tweezer **4A** mit Aciridin-, Anthracen- oder Phenanthren- Seitenwänden bilden dagegen in Gegenwart von elektronenarmen polycyclischen Nitroaromaten, wie 2,4,7-Trinitrofluorenon **6A** recht stabile EDA-Komplexe.^[60-62] Auch die von Nolte *et al.* synthetisierten Klammern bzw. Clips **5A**, die über eine Glycolurileinheit verfügen, an die aromatische Einheiten anneliert sind, können über π - π -Stapelwechselwirkungen elektronenarme aromatische Verbindungen komplexieren.^[63]

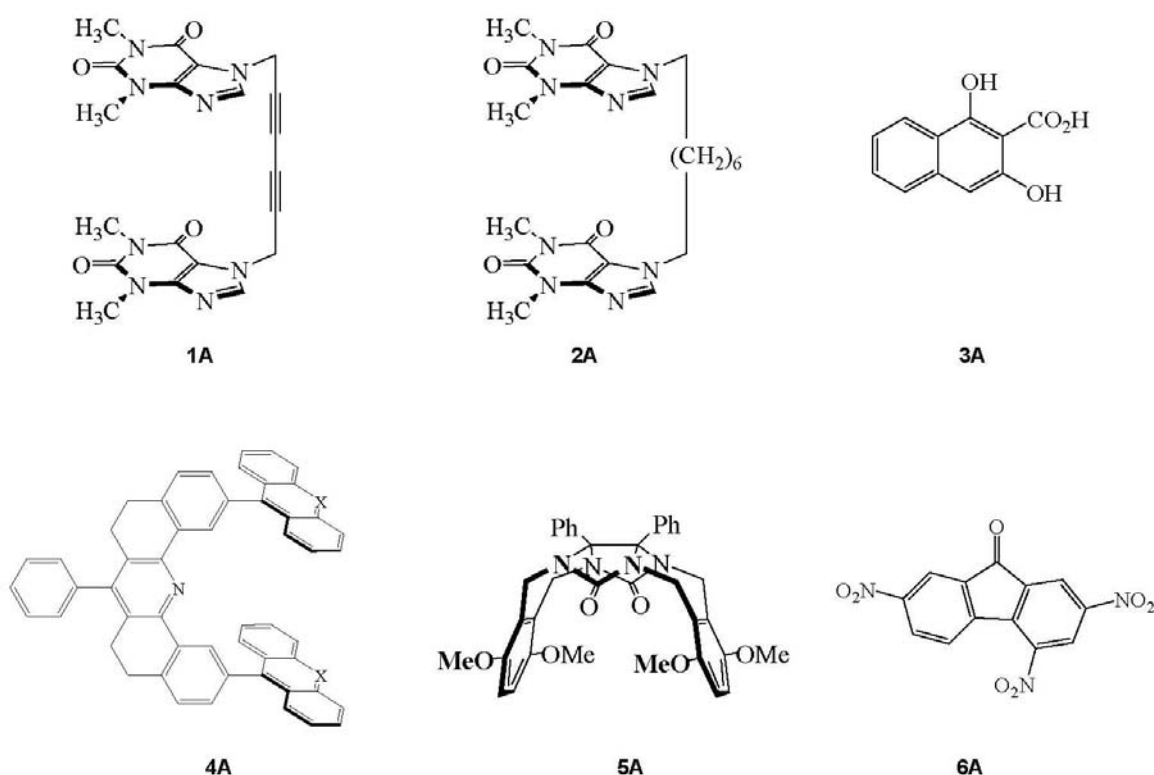


Abbildung 1.3: Strukturen molekularer Tweezer und Clips. Oben: Strukturformeln des molekularen Tweezers **1A** und **2A** mit Koffeineinheit nach Chen und Whitlock, sowie des Substrats 1,3-Dihydroxynaphthalin-2-carbonsäure **3A**. Unten: Strukturformeln der molekularen Tweezer **4A** nach Zimmermann und des molekularen Clips **5A** nach Nolte, sowie des Gastmoleküls 2,4,7-Trinitrofluorenon **6A**.

Die Arbeitsgruppe Klärner der Universität Duisburg-Essen hat ebenfalls eine Vielzahl molekularer Clips und Tweezers entwickelt, die alle über eine höchst elektronenreiche Kavität verfügen und sich daher bereits als potente Wirtmoleküle gegenüber verschiedenen elektronenarmen Gastmolekülen bewährt haben. Die ersten tetramethylenüberbrückten Tweezers aus Norbornadien-, Benzol- und Naphthalineinheiten wurden von Benkhoff synthetisiert.^[64, 65] Diese carbmethoxy-substituierten Derivate stellen nur schwache Rezeptoren dar, die mit aromatischen und aliphatischen Gastmolekülen nur schwache Komplexe eingehen. Basierend auf den Arbeiten von Benkhoff gelang Kamieth und Burkert schließlich die Synthese der an den terminalen Benzolringen unsubstituierten Benzol- und Naphthalin-Tweezers.^[66-68] Die in Abbildung 1.4 dargestellten neuen Rezeptormoleküle sind nun in der Lage, mit einer Vielzahl elektronenarmer aromatischer und aliphatischer Substratmolekülen stabile Wirt-Gast-Komplexe zu bilden.

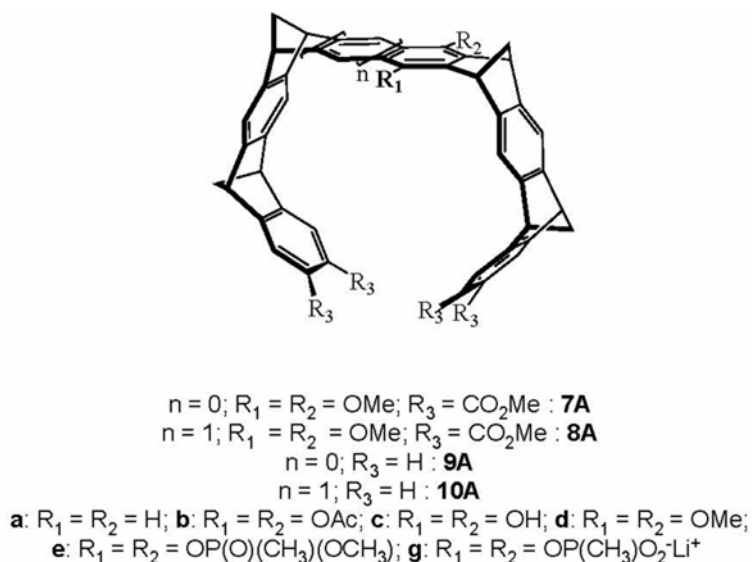


Abbildung 1.4: Übersicht der molekularen Tweezers nach Klärner *et al.*.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Benzol-Tweezers ($n=0$) bevorzugt aliphatische Gäste komplexieren, während die Naphthalin-Tweezers ($n=1$) vor allem mit aromatischen Gastmolekülen stabile Komplexe bilden. Diese Selektivität der Tweezer-Moleküle gegenüber den elektronenarmen Gastmolekülen ließ sich durch Berechnungen der elektrostatischen Potentialoberfläche (EPS) mittels quantenchemischer Rechenmethoden (AM1, DFT, ab initio) erklären.^[69, 70] Während die konkave Seite der Rezeptoren ein auffällig negatives Potential (hohe Elektronendichte) aufweist, zeigen die akzeptorsubstituierten neutralen und kationischen Substrate ein deutlich positives Potential (geringe Elektronendichte). Dies ist ein

Zeichen dafür, dass eine ausgeprägte Komplementarität der elektrostatischen Potentiale zwischen Wirt und Gast besteht. Um Hinweise darauf zu bekommen, in wie weit die Rezeptortopologie die Substratselektivität beeinflusst, wurde die Zahl der Methylenbrücken von vier in den Tweezern auf zwei in den Clips reduziert.^[71, 72] Abbildung 1.5 zeigt eine Übersicht aller in der Arbeitsgruppe Klärner synthetisierten molekularen Clips.

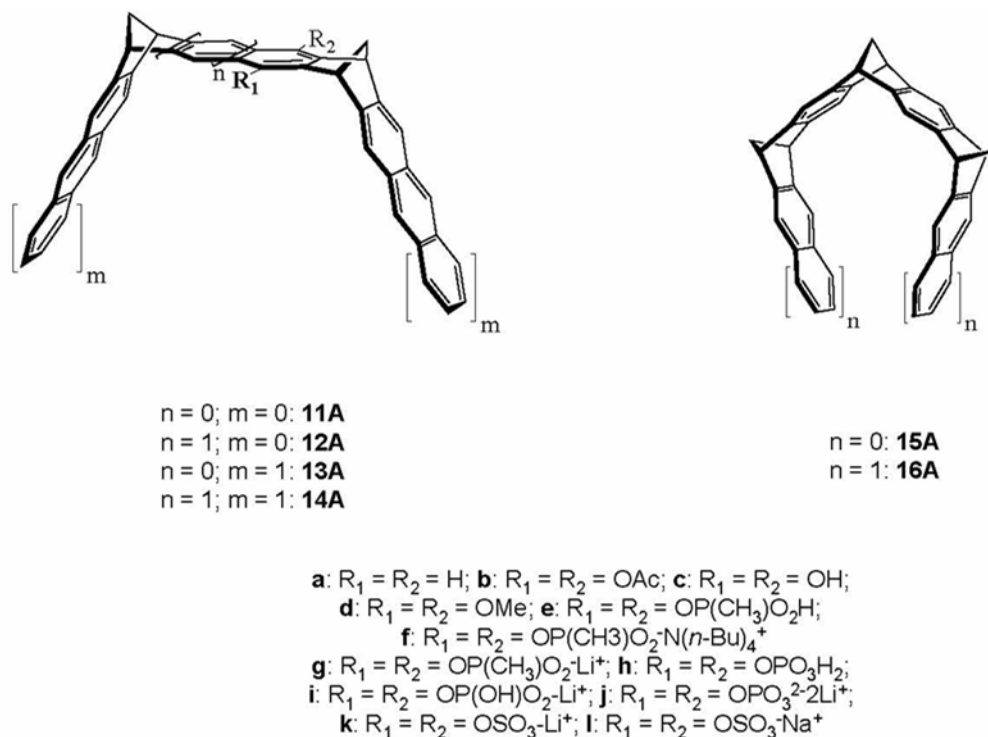


Abbildung 1.5: Übersicht der molekularen Clips nach Klärner *et al.*.

Die Synthese des ersten dimethylenüberbrückten Clips vom Typ **11A** gelang Panitzky.^[71] Ähnlich wie die molekularen Tweezers weisen auch die molekularen Clips eine negative elektrostatische Potentialoberfläche auf. Daher können auch diese selektiv elektronenarme Substrate komplexieren. Allerdings sind die molekularen Clips im Gegensatz zu den molekularen Tweezern aufgrund ihrer offenen Struktur weniger selektiv gegenüber Größe und Form der Substrate. Ferner trägt ihre offene Struktur dazu bei, dass bei der Komplexierung der Abstand der Seitenarme der Clips komprimiert werden muss. Diese Komprimierung führt zu einer energetisch ungünstigen Bindungswinkeldeformation in den Norbornadieneinheiten. Ein weiterer Grund für die schwächeren Komplexeigenschaften der molekularen Clips könnte mit der geringeren Anzahl von van-der-Waals-Kontaktflächen verglichen mit denen des Benzol- bzw. Naphthalin-Tweezers zusammenhängen. Die Komplexeigenschaften der molekularen Clips lassen sich allerdings je nach Wahl des Substituenten an der zentralen

Benzol-„Spacereinheit“ entscheidend beeinflussen. Dabei nimmt die Bindungskonstante in der folgenden Reihenfolge ab: $\text{OH} > \text{OAc} > \text{OMe}$. Dies lässt sich wie folgt erklären. Während die Methoxygruppen die Kavität der Clips abschirmen, ermöglichen die Acetoxygruppen mit ihrem Carbonylsauerstoffatom attraktive Wechselwirkungen mit dem Substratmolekül. Der hydroxysubstituierte Clip **11Ac** (später als **13S** bezeichnet) stellt dabei einen noch effektiveren Rezeptor dar, da dieser zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zum Substrat ausbildet. Ein weiteres Ziel der Arbeitsgruppe Klärner bestand darin, diese Rezeptoren in wasserlösliche Verbindungen zu überführen. Auf diese Weise sollte es möglich sein, deren Einfluss in biologischen Systemen direkt zu untersuchen. Der erste Versuch dazu sah die Einführung dentritischer Substituenten vor.^[73] Allerdings stellte sich schnell heraus, dass diese nicht besonders gut als Substituenten geeignet waren. Aufgrund ihrer Größe blockierten diese die Kavität des Clips **17A** und trugen damit zu einer deutlichen Verminderung der Komplexeigenschaften bei. In einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe Schrader konnte dieses Problem letztendlich gelöst werden. Durch die Einführung der wesentlich kleineren Phosphonat-Substituenten gelang es die Wasserlöslichkeit der Rezeptoren unter gleichzeitiger Erhaltung ihrer hervorragenden Komplexeigenschaften deutlich zu erhöhen.^[74-77] Ferner bildeten die Phosphonat-Substituenten attraktive Wechselwirkungen mit den positiv polarisierten Gastmolekülen und förderten folglich die molekulare Erkennung des Substrats, indem sie wie Pinzettenspitzen das Substratmolekül in der Kavität festhielten. Damit war die Grundvoraussetzung geschaffen, Rezeptormoleküle in biologisch relevanten Prozessen unter physiologischen Bedingungen einsetzen zu können. In Abbildung 1.6 sind sowohl der dentritische als auch der Phosphonat-substituierte Clip dargestellt.

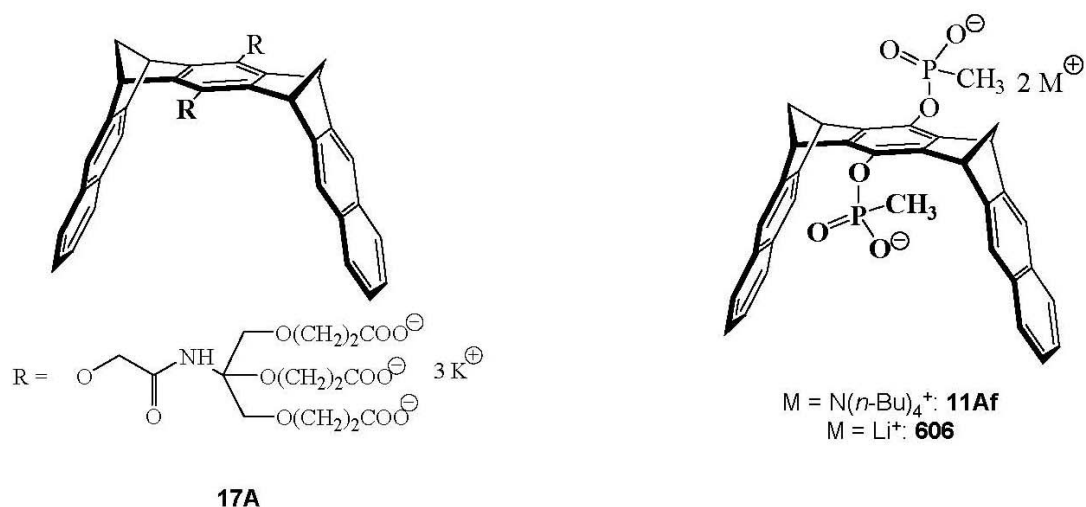


Abbildung 1.6: Die ersten wasserlöslichen molekularen Clips nach Klärner *et al.*. Links: Benzol-Clip mit dentritischen Substituenten. Rechts: Benzol-Clip mit Phosphonat-Substituenten.

Neben dem Phosphonat-substituierten Clip **606** konnte von Fokkens auch der Phosphonat-substituierte Tweezer **734** synthetisiert werden.^[75] Diese beiden Rezeptormoleküle waren die ersten wasserlöslichen Rezeptormoleküle, die zudem über hervorragende Komplexeigenschaften verfügten. Während Clip **606** bevorzugt elektronenarme aromatische Gäste komplexiert, bildet Tweezer **734** bevorzugt mit elektronenarmen aliphatischen Gästen Komplexe. Durch die Einführung von Phosphat-Substituenten mit anschließender Neutralisation zu den entsprechenden Lithium- und Natriumsalzen konnte Bastkowski die Wasserlöslichkeit und Komplexeigenschaften beider Rezeptormoleküle mit zentraler Benzol-„Spacereinheit“ deutlich erhöhen.^[78, 79] In Abbildung 2.1 sind sowohl die beiden Phosphonat-substituierten Wirtmoleküle Clip **606** und Tweezer **734** als auch die beiden Phosphat-substituierten Wirtmoleküle Clip **622** und Tweezer **750** abgebildet.

Damit waren vier wasserlösliche Rezeptormoleküle gegeben, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratspezifität – die beiden Clips **606** und **622** komplexieren bevorzugt Pyridiniumsalze, die beiden Tweezers **734** und **750** bevorzugt basische aliphatische Aminosäuren - für biomedizinische Anwendungen interessant sein könnten.

Zwei ähnliche interessante wasserlösliche Rezeptormoleküle, die in anderen Arbeitskreisen synthetisiert wurden, sind das von Urbach *et al.* entwickelte Cucurbit[8]uril und das von Dougherty *et al.* dargestellte Cyclophan.^[50, 57] Beide Rezeptorsysteme sind ebenfalls wasserlöslich und können selektiv aliphatische oder aromatische Aminosäuren komplexieren. Während Cucurbit[8]uril im Komplex mit Methylviologen selektiv die aromatische Aminosäure Tryptophan bindet, komplexiert Cyclophan bevorzugt die aliphatische Aminosäure Arginin. Nach heutigem Forschungsstand sind diese beiden Rezeptormoleküle allerdings noch nicht in biologischen Systemen getestet worden.

2 Ziele der Arbeit

Die größte Herausforderung dieser Arbeit bestand darin, den Einsatz der bereits bekannten wasserlöslichen Phosphonat- und Phosphat-substituierten Rezeptormoleküle, der beiden Clips **606** und **622** sowie der beiden Tweezers **734** und **750** als potentielle Inhibitoren für enzymatische Reaktionsabläufe unter physiologischen Bedingungen zu prüfen. Die Strukturen dieser vier Rezeptormoleküle sind in der Abbildung 2.1 dargestellt.

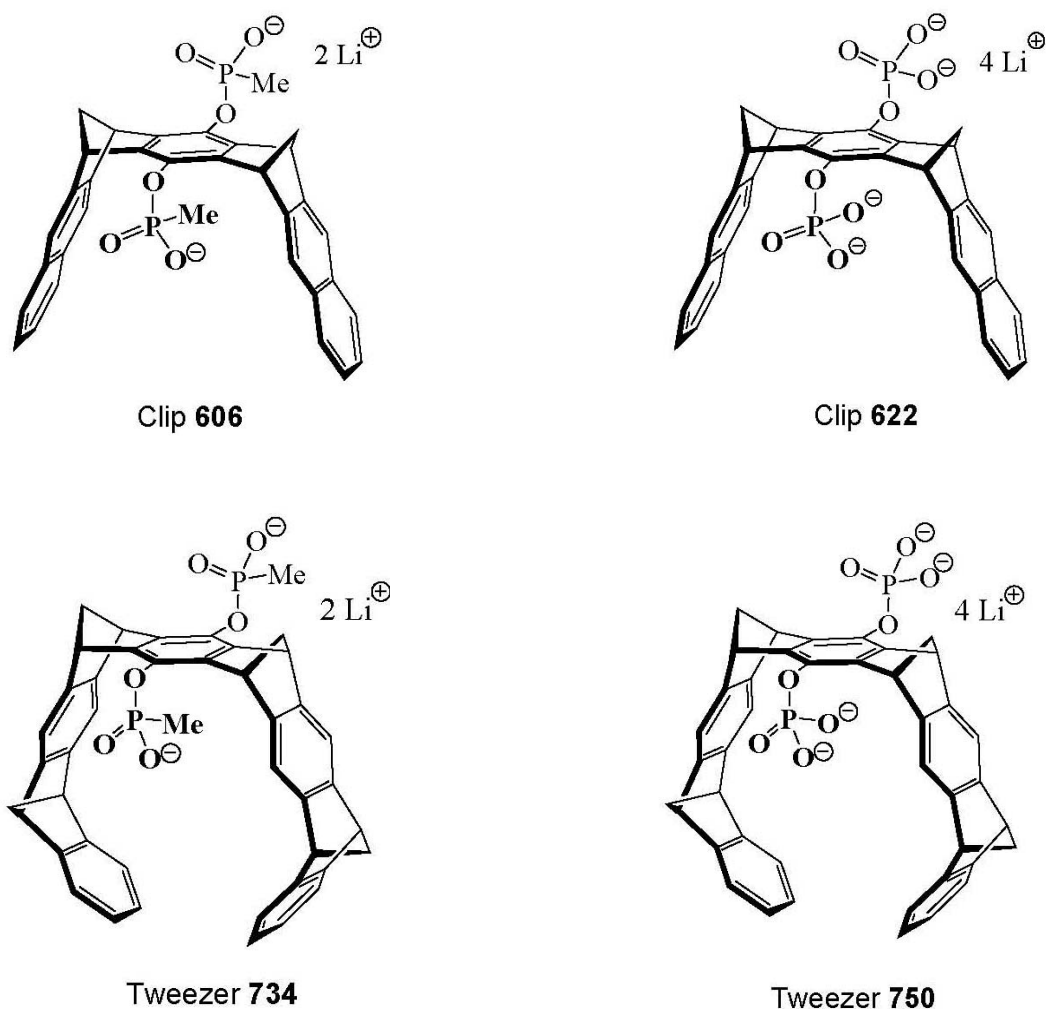


Abbildung 2.1: Molekulare Phosphonat- und Phosphat-substituierte Clips und Tweezers mit zentraler Benzol-„Spacereinheit“.

Wie bereits Fokkens und Bastkowski in ihren Arbeiten erfolgreich zeigen konnten, weisen diese vier Rezeptormoleküle eine hohe Selektivität gegenüber biologisch interessanten Gästen auf und gehen mit diesen recht stabile Wirt-Gast-Komplexe ein.^[75, 78-80] Während die beiden Clips **606** und **622** bevorzugt elektronenarme aromatische Cofaktor-Moleküle, wie z. B. Nikotinamadenindinukleotid (NAD^+), Nikotinamadenindinukleotid-Phosphat (NADP^+), Thiamindiphosphat (TDP) und *S*-Adenosylmethionin (SAM) in ihrer Kavität inkludieren, komplexieren die beiden Tweezers **734** und **750** selektiv basische Aminosäuren, wie z. B. Lysin und Arginin.^[76, 80, 81] Der Komplex mit Lysin ist dabei wesentlich stärker als der mit Arginin. Diese unterschiedliche Substratspezifität beider Rezeptorklassen ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

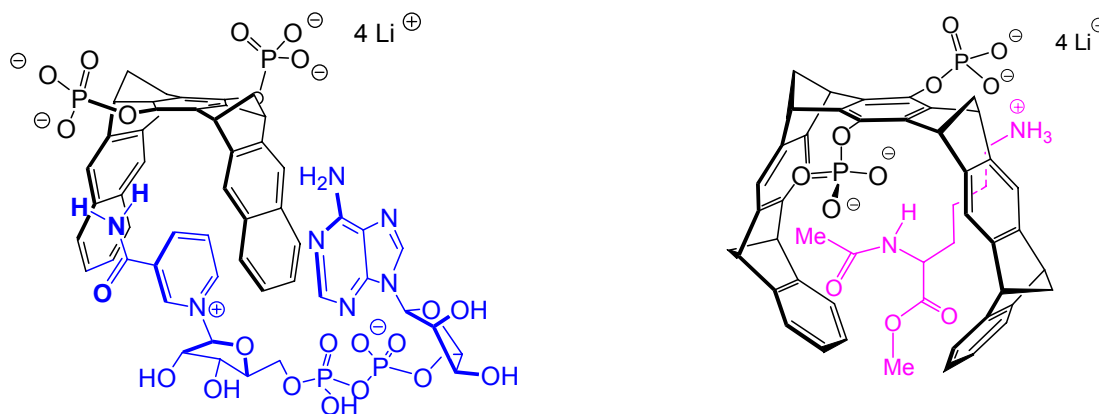


Abbildung 2.2: Lewis-Strukturen des Clips **622** mit komplexiertem Cofaktor NAD^+ und des Tweezers **750** im Komplex mit dem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe. Beide Lewis-Strukturen stützen sich auf Molekülrechnungen (MacroModel 8.1, 5000 Schritte, Wasser, Amber).

Im Gegensatz zu den beiden Clips, die unabhängig vom Phosphor-Substituenten die Cofaktoren NAD^+ und NADP^+ etwa gleich stark binden, treten im Fall des Tweezers deutliche Unterschiede bei den Dissoziationskonstanten auf. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Fluoreszenztitrationsexperimenten eindeutig nachgewiesen werden, dass der Phosphat-substituierte Tweezer **750** die beiden basischen Aminosäuren um ein Vielfaches stärker komplexiert als der entsprechende Phosphonat-substituierte Tweezer **734**. So komplexiert Tweezer **750** das geschützte Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe etwa dreizehnmal stärker als Tweezer **734**. Diese Beobachtung ist mit den in Zusammenarbeit mit Bastkowski durchgeführten ^1H -NMR-Titrationen konform.^[79]

Ihre Wasserlöslichkeit, verknüpft mit ihrer Fähigkeit, selektiv biologisch relevante Moleküle, in diesem Fall NAD(P)^+ , sowie die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin mit Dissoziationskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich zu komplexieren, sollte nun den Einsatz dieser vier Rezeptormoleküle in biologisch relevanten Systemen unter physiologischen Konditionen ermöglichen. In der Tabelle 2.1 ist eine Übersicht der Dissoziationskonstanten aller vier Rezeptoren mit ihren unterschiedlichen Gästen dargestellt.

<i>Substrat/Rezeptor</i>	Clip		Tweezer		Mess-Methode
	606	622	734	750	
	K_D [μM]		K_D [μM]		
NAD^+	250 ^{a,c)}	208 ^{b,c)}	-	-	NMR
	204 ^{d)}	141 ^{d)}	-	500 ^{d)}	FT
	182 ^{c)}	222 ^{c)}	-	-	ITC
NADP^+	910 ^{a,c)}	303 ^{a,c)}	-	-	NMR
	197 ^{d)}	222 ^{d)}	-	-	FT
	1490 ^{d)}	970 ^{d)}	-	-	ITC
NMNA	-	30 ^{a,c)}	-	-	NMR
DC	-	135 ^{a,c)}	-	-	NMR
H-Lys-OH	9090 ^{a,c)}	4762 ^{a,c)}	714 ^{b,c)}	40 ^{b,c)}	NMR
	-	-	874 ^{d)}	21 ^{d)}	FT
Ac-Lys-OMe	6250 ^{a,c)}	1786 ^{a,c)}	227 ^{b,c)}	20 ^{b,c)}	NMR
	-	-	68 ^{d)}	18 ^{d)}	FT
H-KKKK-OH	-	-	-	10 ^{d)}	FT

Tabelle 2.1: Dissoziationskonstanten K_D der vier Rezeptormoleküle. ^{a)} ^1H -NMR-Titration mit konstanter Substratkonzentration^[79]; ^{b)} ^1H -NMR-Verdünnungstitration^[79]; ^{c)} Puffer pH = 7.2; ^{d)} Puffer pH = 7.6

Da NAD(P)^+ eine bedeutende Rolle als Cofaktor in zahlreichen enzymvermittelten Redoxprozessen der Natur einnimmt und von beiden Clips **606** und **622** im mikromolaren Bereich gebunden wird, war der grundlegende Gedanke dieser Arbeit, mit Hilfe dieser beiden Rezeptormoleküle das Zielmolekül NAD(P)^+ aus dem aktiven Zentrum des entsprechenden Enzyms, der so genannten „Rossmann-Spalte“, herauszuziehen und in ihrer Kavität zu binden. Dadurch könnten beide Cofaktoren ihre Funktion als Wasserstoffüberträger in Redoxreaktionen nicht mehr ausüben und die Folge wäre letztendlich Inhibition der enzymatischen Aktivität. Dies wäre der erste bekannte Fall, bei dem durch den Einsatz synthetischer Rezeptormoleküle durch Cofaktor-Abfang enzymatische Reaktionen unter

physiologischen Bedingungen kontrolliert beeinflusst werden könnten. Diese Art der Enzymhemmung würde sich damit deutlich von der oft durch Substrat-Mimetika induzierten Inhibition unterscheiden. Nicht die strukturell optimale Anpassung der Rezeptormoleküle an die Enzym-Bindungsstelle, sondern mittels Supramolekularer Chemie unter Ausbildung eines entsprechenden Wirt-Gast-Komplexes würde hier zur Enzyminhibition führen. Der Einsatz der beiden Clips ist allerdings nur auf solche Enzyme beschränkt, bei denen der Cofaktor NAD(P)⁺ nicht allzu stark in der „Rossmann-Spalte“ gebunden wird. Andernfalls wären die beiden Clips nicht mehr in der Lage, einen im Vergleich zur Enzym-Bindungsstelle stabileren Komplex mit dem Cofaktor zu bilden.

Ferner sollte untersucht werden, ob eine Enzymhemmung auch durch die Anwesenheit der beiden Tweezers **734** und **750** möglich ist. Da die meisten Proteinoberflächen basische Aminosäurenreste aufweisen, wäre es denkbar, dass sich z. B. durch Komplexierung kritischer Lysine oder Arginine, die sich in der Nähe für die enzymatische Umsetzung wichtiger Orte, wie z. B. der „Rossmann-Spalte“ befinden, die Enzymaktivität ebenfalls beeinflussen lässt. Durch diese Komplexierung könnten die Inhibitoren dem Cofaktor den Zugang zur „Rossmann-Spalte“ blockieren und damit die enzymatische Umsetzung verhindern. Dies wäre ein zweiter neuer Hemm-Mechanismus, mit dem man die Enzymaktivitäten mittels Supramolekularer Chemie beeinflussen könnte.

Zur Überprüfung sollte zunächst als einfaches Modell die Alkohol-Dehydrogenase (ADH) herangezogen werden. Nach erfolgreicher Durchführung könnten die Untersuchungen mit Enzymen, die aus klinischer Sicht interessante Zielmoleküle darstellen, fortgesetzt werden.

Parallel dazu war eine Optimierung der Rezeptormoleküle vorgesehen, mit denen sich eine noch effizientere Inhibition erzielen lassen sollte. Polymerisierfähige Tweezer könnten z. B. in der Lage sein, mehrere benachbarte kritische basische Aminosäurenreste noch effektiver zu komplexieren. Dadurch ließe sich eine Verringerung des IC₅₀-Wertes erzielen.

Des Weiteren sollten die Rezeptormoleküle mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, um den Weg für Zellkultur-Experimente zu öffnen. Mit ihrer Hilfe könnte dann künftig festgestellt werden, wo genau die Inhibition durch die Rezeptormoleküle erfolgt. Dies wäre insbesondere für das Alzheimer-Kooperationsprojekt mit G. Bitan von der David Geffen School of Medicine in Los Angeles von essentieller Bedeutung. G. Bitan hatte herausgefunden, dass sich durch den Einsatz des nichttoxischen Phosphat-Tweezers **750** die für die Alzheimersche Krankheit verantwortliche A β (1-42)-Aggregation inhibieren lässt. Mit

Hilfe der Massen- und ^{15}N -NMR-Spektroskopie konnte G. Bitan *et al.* bereits eindeutig beweisen, dass der Tweezer **750** aufgrund seiner hohen Lysin-Selektivität bevorzugt die beiden in diesem Peptidabschnitt befindlichen Lysine K16 und K28 sowie das Arginin R5 komplexiert. Es wird angenommen, dass dabei die Komplexierung des Lysins K28 von essentieller Bedeutung ist. Sobald der Tweezer **750** das Lysin K28 komplexiert, kann dieses keine Salzbrücke mehr mit dem Aspartat D23 ausbilden. Dadurch ist die Bildung eines β -Turns, die durch die Salzbrücke entsteht und die für die Aggregation verantwortlich ist, nicht mehr möglich. Die Aggregation ist damit inhibiert. Mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Tweezers **750** wäre es möglich den Ort in der Zelle nachzuweisen, wo genau der Tweezer seine inhibitorische Wirkung entfaltet. Ferner könnte mit dessen Hilfe eindeutig die Frage geklärt werden, ob der Tweezer **750** in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

3 Definitionen und Methoden

3.1 Enzyme (Fermente)

Die Barriere der Aktivierungsenergie hat für das Leben eine zentrale Rolle. Ohne diese Energieschranke würden Proteine, DNA und andere komplexe Moleküle der Zelle rasch zerfallen. Der Grund dafür, dass Moleküle langfristig existieren können, liegt darin, dass nur wenige von ihnen bei den typischen Temperaturen, die in einer Zelle herrschen, die Hürde der Aktivierungsenergie überwinden können und daher solche Zerfallsreaktionen nur sehr langsam ablaufen. Damit physiologische Reaktionen rascher ablaufen, müsste Energie zugeführt werden. Dies wäre z. B. durch Temperaturerhöhung prinzipiell möglich. Allerdings würden auf diese Weise alle möglichen Reaktionen unselektiv beschleunigt werden. Es käme zu einem chemischen Chaos, und ein geregelter Stoffwechsel wäre damit unmöglich.^[13] Ferner würden bei zu hohen Temperaturen die nicht-kovalenten Wechselwirkungen, die die aktive Konformation der Enzyme stabilisieren, dermaßen gestört, dass es schließlich zur Denaturierung käme.^[82] Um dies zu vermeiden, bedienen sich die Organismen der katalytischen Wirkung von Enzymen. Hierdurch werden die Aktivierungsenergie-Barrieren selektiv herabgesetzt und die Geschwindigkeit dieser Reaktionen ohne Temperatureinfluss erhöht. Bei einer enzymatischen Reaktion bindet das Substrat an das aktive Zentrum („Active Site“ oder „Rossmann-Spalte“).^[12, 13] Dieses befindet sich oft in einer Vertiefung an der Enzymoberfläche. Gemäß Abbildung 3.1 kommt es dabei zur Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes. Dieser lagert sich im Laufe der Reaktion zum Enzym-Produkt-Komplex um und zerfällt anschließend rasch zum Enzym und freien Produkt. Gemäß dem „Schlüssel-Schloss“-Prinzip passt nur ein bestimmtes Substrat zum jeweiligen Enzym. Dies erklärt die hohe Substratspezifität von Enzymen.^[26]

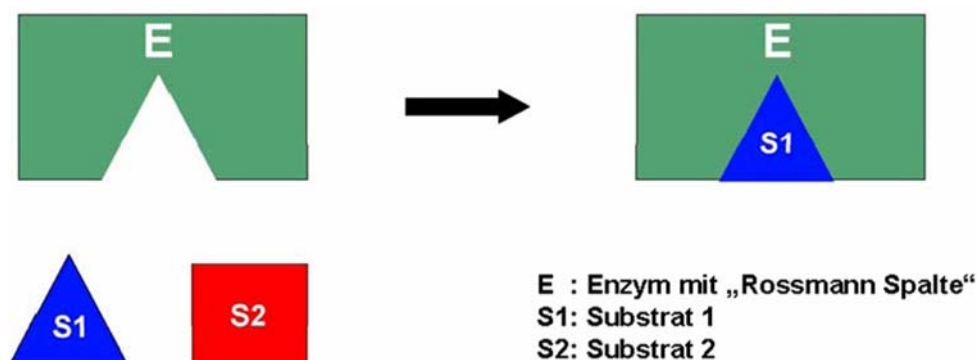


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des „Schlüssel-Schloss“-Prinzips.

An der katalytischen Umwandlung des Substrats zum Produkt sind nur die geladenen oder hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren beteiligt, die das aktive Zentrum bilden. Diese bewirken, dass das Substrat in der für die Reaktion optimalen räumlichen Anordnung fixiert wird. Nachdem das Produkt das aktive Zentrum verlassen hat, ist das Enzym für ein neues Substratmolekül wieder frei zugänglich. Analog zu anderen Katalysatoren gehen auch Enzyme aus einer Reaktion in ihrer ursprünglichen Form wieder hervor. Daher sind schon relativ kleine Enzymmengen in der Lage große Substratmengen umzusetzen und so den Stoffwechsel erheblich zu beeinflussen. Die Leistungsfähigkeit eines einzelnen Enzymmoleküls wird durch die Wechselzahl k_{cat} (turn over number) zusammen mit der Michaelis-Menten-Konstante K_m charakterisiert.

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\text{max}}}{[E]} \quad (1)$$

Die Wechselzahl bestimmt die Zahl der Umsätze, die jedes aktive Zentrum pro Zeiteinheit katalysiert. Sie ergibt sich aus dem Quotienten der Aktivität (v_{max}) und der entsprechenden Enzymkonzentration und besitzt die Dimension $[s^{-1}]$. Die Wechselzahlen der meisten Enzyme und ihrer Substrate liegen im Bereich zwischen 0.5 (Lysozym/Murein), 10^3 (Dehydrogenasen/NADH, FADH₂) und 10^6 (Carboanhydrasen/CO₂). Die Enzymaktivität wird nach internationaler Übereinkunft in internationalen Einheiten (IU *International Unit*) angegeben. Eine Unit entspricht dabei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen (Temperatur, pH, Substratsättigung) ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt (1U = 1 $\mu\text{mol/min}$). Da die meisten Reaktionen reversibel verlaufen und ein Enzym sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion beeinflussen kann, katalysiert das Enzym die Reaktion in Richtung des chemischen Gleichgewichts. Um die Aktivierungsenergie zu senken und damit die Reaktion zu katalysieren, nutzen Enzyme unterschiedliche Strategien. Ein Beispiel dafür ist die so genannte induzierte Passform („Induced Fit“).^[13, 73] Wie man der Abbildung 3.2 entnehmen kann, bildet das aktive Zentrum dabei eine spezifisch geformte Tasche, in der das Substrat räumlich orientiert wird. Durch die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum des Enzyms werden im Substratmolekül wichtige chemische Bindungen, die während einer Reaktion gespalten werden müssen, gedehnt oder gedreht. Ein weiterer Mechanismus besteht darin, dass das aktive Zentrum eine Mikroumgebung für das Substrat innerhalb des Enzyms bildet. Wenn z. B. ein aktives Zentrum aus sauren Aminosäuren wie z. B. Glutamat besteht, dann bildet es für die Substrate eine saure Tasche in einer ansonsten neutralen Zelle und ermöglicht damit deren Protonierung.

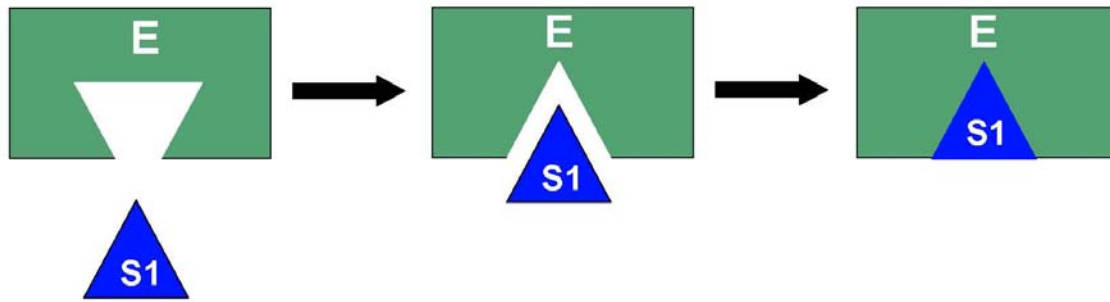
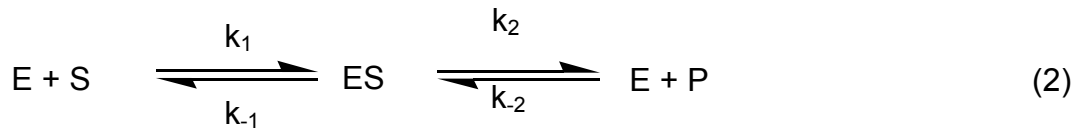


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der „Induced Fit“-Theorie.

Die meisten Enzyme benötigen für ihre katalytische Aktivität so genannte Cofaktoren, die entweder permanent und fest an das aktive Zentrum gebunden sind (prosthetische Gruppen), oder sich erst zusammen mit dem Substrat reversibel binden. Dabei können anorganische Metallionen, wie z. B. Zn^{2+} , Fe^{2+} und Mg^{2+} als strukturstabilisierende Koordinationszentren, Redox-Partner oder als Lewis-Säuren fungieren, die die Katalyse unterstützen. Aber auch organische Moleküle wie z. B. NAD^+ , NADP^+ und FAD^+ können als Cofaktoren dienen. In diesem Fall unterscheidet man zwischen Coenzymen bei fester Bindung und Cosubstraten bei reversibler Bindung. Der Komplex aus Enzym und Coenzym wird als Holoenzym und der Proteinanteil alleine als Apoenzym bezeichnet.^[12, 13]

3.2 Michaelis-Menten-Theorie

Die Michaelis-Menten-Theorie dient als Modell zur kinetischen Beschreibung einfacher Enzymreaktionen.^[12, 13] Sie liefert einen Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit v einer Enzymreaktion sowie den Konzentrationen von Enzym $[\text{E}]$ und Substrat $[\text{S}]$. Dieses Modell basiert auf der Annahme, dass ein Enzym mit einem Substratmolekül einen Enzym-Substrat-Komplex bildet, der entweder in Enzym und Produkt oder in seine Edukte zerfällt. Was schneller erfolgt, hängt von den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten k ab. Die Michaelis-Menten-Theorie besagt, dass mit zunehmender Substratkonzentration auch die Reaktionsgeschwindigkeit zunimmt. Dies erfolgt anfangs linear und flacht dann kontinuierlich ab bis schließlich auch weitere Substratzugabe die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr beeinflusst. Michaelis-Menten-Enzyme zeigen also ein hyperboles Sättigungsverhalten. Den einfachsten Fall einer enzymkatalysierten Reaktion beschreibt die Gleichung (2).



Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} entsprechen der Assoziation von Enzym und Substrat bzw. der Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes. Die entsprechenden Konstanten k_2 und k_{-2} geben die Reaktion zum Produkt bzw. die Rückreaktion zum Enzym-Substrat-Komplex an. Von 0 ausgehend erreicht mit zunehmender Substratkonzentration die Anfangsgeschwindigkeit v einen Maximalwert v_{\max} , der auch durch weitere Substratzugabe nicht überschritten werden kann. Die Abbildung 3.3 stellt diese Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms von der Substratkonzentration graphisch dar.

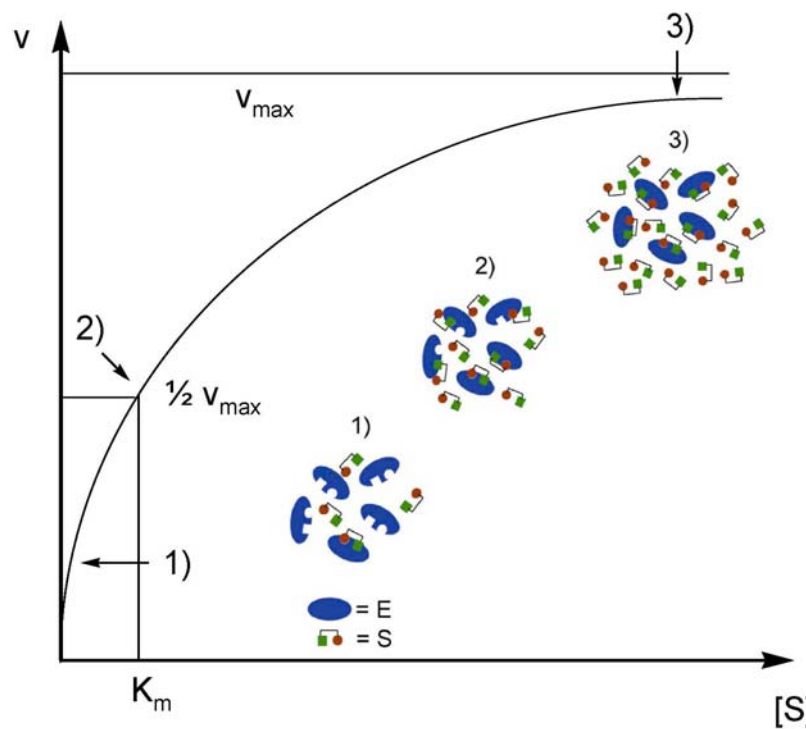


Abbildung 3.3: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v von der Substratkonzentration $[S]$. 1) Niedrige Substratkonzentration; 2) Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit; 3) hohe Substratkonzentration

An den Punkten 1 und 2 hat noch nicht jedes Enzymmolekül Substrat gebunden, obwohl ein Substratüberschuss vorliegt. Daher strebt die Gleichgewichtskonstante der folgenden Reaktion noch nicht gegen unendlich ($[E] > 0$).



D. h. eine Erhöhung oder Verringerung der Substratkonzentration führt dazu, dass mehr oder weniger Substratmoleküle an das Enzym unter Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES) gebunden werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt also in diesem Fall von der Substratkonzentration ab. Bei Punkt 2 ist genau die Hälfte aller Enzymmoleküle mit Substrat beladen. Die Reaktionsgeschwindigkeit entspricht daher genau der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit v_{\max} . Im Punkt 3 ist die Substratsättigung des Enzyms dargestellt. Alle Enzymmoleküle sind mit Substrat besetzt. Eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit ist nicht mehr möglich.

Unter der Voraussetzung, dass die Umwandlung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) zu Produkt und Enzym ($P + E$) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, verhält sich die Reaktionsgeschwindigkeit proportional der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes.

$$v = k_2 [ES] \quad (4)$$

Entspricht $[E_t]$ der Gesamtmenge an Enzym, dann ergibt sich für die Maximalgeschwindigkeit der Enzymkatalyse folgender Ausdruck:

$$v_{\max} = k_2 [E_t] \quad (5)$$

Die Menge an freiem Enzym wird durch den Term ($[E_t] - [ES]$) beschrieben. Damit lässt sich die Bildungsgeschwindigkeit von ES aus E und S wie folgt ausdrücken:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 ([E_t] - [ES]) [S] \quad (6)$$

Die Rückreaktion von $E + P$ zu ES ist dabei zu vernachlässigen und kann daher unberücksichtigt bleiben. Die Zerfallsgeschwindigkeit von ES zu $E + S$ entspricht der Summe zweier Reaktionen:

$$\frac{-d[ES]}{dt} = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad (7)$$

Im so genannten Fließgleichgewicht (Steady State), bei dem die Konzentration des Zwischenproduktes ES konstant bleibt und sich nur die Edukt- und Produktkonzentrationen ändern, sind die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeiten gleich groß:

$$k_1 ([E_t] - [ES]) [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad (8)$$

$$\frac{([E_t] - [ES]) [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (9)$$

K_m entspricht dabei der Michaelis-Menten-Konstante, die die Einheit mol/L hat. Wenn man diese Gleichung nach $[ES]$ auflöst, ergibt sich die so genannte Michaelis-Menten-Gleichung (10). Diese beschreibt das Aktivitätsverhalten vieler Enzyme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Durch Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung erhält man die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion in Abhängigkeit von $[S]$ und K_m (12).

$$[ES] = \frac{[E_t] [S]}{K_m + [S]} \quad (10)$$

$$v = k_2 \frac{[E_t] [S]}{K_m + [S]} \quad (11)$$

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (12)$$

Wenn die Substratkonzentration sehr viel kleiner ist als K_m , verhält sich die Reaktionsgeschwindigkeit v direkt proportional zur Substratkonzentration $[S]$:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \approx \frac{v_{\max} [S]}{K_m} = K' [S] \quad (13)$$

Ist die Substratkonzentration deutlich größer als K_m , nähert sich die Reaktionsgeschwindigkeit v der Maximalgeschwindigkeit v_{\max} an:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \approx \frac{v_{\max} [S]}{[S]} = v_{\max} \quad (14)$$

Sind die Substratkonzentration und die Michaelis-Menten-Konstante gleich groß, dann erreicht die Geschwindigkeit v die Hälfte des Maximalwerts v_{\max} :

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{v_{\max} [S]}{[S] + [S]} = \frac{v_{\max} [S]}{2 [S]} = \frac{v_{\max}}{2} \quad (15)$$

Wenn $k_2 < k_{-1}$ ist, dann geht die Michaelis-Menten-Konstante (9) in die Assoziationskonstante $K_a = k_2/k_{-1}$ über. In diesem Fall entspricht K_m der Assoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes und dient damit als direktes Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Mit Hilfe der Parameter K_m und k_{cat} lassen sich ferner Aussagen über die katalytische Effizienz der Enzyme treffen. Ein sehr kleiner K_m -Wert bedeutet z. B., dass das Enzym schon bei relativ niedriger Substratkonzentration seine Maximalgeschwindigkeit erreicht und damit äußerst effizient arbeitet. Bei niedrigen Substratkonzentrationen stellt die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_m ein geeignetes Maß für die katalytische Effizienz der Enzyme dar. Für den Fall, dass sie Werte von über 10^8 oder $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ annimmt, wird die Reaktionsgeschwindigkeit v lediglich durch die Diffusion der Substrat- und Enzymmoleküle begrenzt. Damit führt jeder Kontakt von Enzym und Substrat zu einer Reaktion. Enzyme mit einer derartigen Effizienz werden als katalytisch perfekt bezeichnet.

Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung lässt sich der K_m -Wert relativ leicht ermitteln, indem man nach Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit v_{\max} die Substratkonzentration sucht, bei der das Enzym nur noch mit der halben Maximalgeschwindigkeit arbeitet. Da sich aber die Maximalgeschwindigkeit v_{\max} aus der hyperbolischen Auftragung von v gegen $[S]$ nur schwer ermitteln lässt, wird die Michaelis-Menten-Gleichung nach Lineweaver und Burk linearisiert.

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (12)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{v_{\max} [S]} \quad (16)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max} [S]} + \frac{[S]}{v_{\max} [S]} \quad (17)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (18)$$

Durch die doppeltreziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk, wie sie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, lässt sich K_m sowohl aus der Geradensteigung m und ihrem Schnittpunkt mit der Ordinate als auch aus ihrem negativen Schnittpunkt mit der Abzisse berechnen.

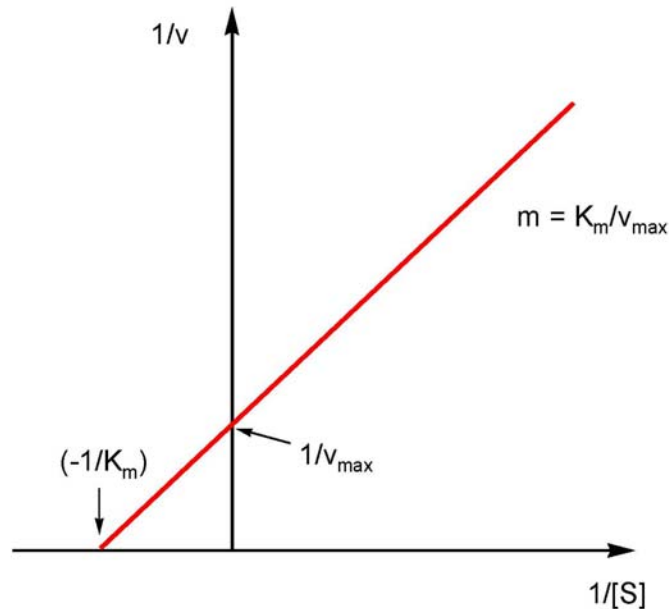


Abbildung 3.4: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v eines Enzyms von der Substratkonzentration $[S]$.

Ferner wird diese Darstellungsart auch oft zur Bestimmung der Inhibitorkonstante verwendet. Anstelle der Reaktionsgeschwindigkeit wird in diesem Fall das Ausmaß der Hemmung der Maximalgeschwindigkeit gegen die Hemmstoffkonzentration aufgetragen.

3.3 Arten der Enzymhemmung

Enzym-katalysierte Reaktionen werden gewöhnlich durch die beiden kinetischen Parameter v_{\max} und K_m charakterisiert. Diese lassen sich mathematisch zu der „Steady-State“-Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) und dessen Zerfallgeschwindigkeit in Beziehung setzen.^[83] Das Ziel enzymkinetischer Untersuchungen besteht sowohl in der Bestimmung der Parameter K_m und v_{\max} für die Substrate als auch in der Ermittlung der Inhibitorkonstanten K_i . Verbindungen, welche die katalytische Aktivität eines Enzyms verändern können, werden als Effektoren bezeichnet. Dabei wird zwischen Aktivatoren und Inhibitoren unterschieden. Im Gegensatz zu Aktivatoren, die die enzymatische Reaktion fördern, hemmen Inhibitoren diese. Je nach Reaktion des Hemmstoffes mit dem Enzym lassen

sich die Inhibitoren in zwei Klassen einteilen. Man unterscheidet zwischen reversiblen und irreversiblen Inhibitoren. Bei der reversiblen Enzymhemmung bindet der Inhibitor so schwach an das Enzym, dass er wieder von diesem abgespalten oder verdrängt werden kann. Diese Art der Enzymhemmung spielt bei der Steuerung solcher Stoffwechselprozesse eine Rolle, bei der bestimmte Reaktionen nur vorübergehend blockiert werden sollen. Bei der irreversiblen Hemmung bindet der Inhibitor dagegen so fest an das Protein, dass er nicht mehr von diesem gelöst werden kann. Diese Art der Inhibition findet z. B. bei einigen Pilzen statt. Diese produzieren zu ihrem Eigenschutz Antibiotika, die in der Lage sind, bestimmte Stoffwechselwege wie z. B. die Proteinbiosynthese anderer Lebewesen irreversibel zu hemmen. Diese Klassifizierung der Inhibitoren überschneidet sich teilweise mit der Einteilung nach dem Bindungsort am Enzym. Erfolgt die Bindung am aktiven Zentrum, so spricht man von einer isosterischen Hemmung. Findet dagegen die Bindung außerhalb des aktiven Zentrums statt, dann handelt es sich um die so genannte allosterische Hemmung.^[12, 13] Enzyminhibitoren finden oft Verwendung als Arzneimittel. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Acetylsalicylsäure. Diese ist unter dem Namen Aspirin[®] weltweit als Kopfschmerzmittel bekannt. Ihre Wirksamkeit beruht auf der irreversiblen Inhibition des für die Prostaglandin-Synthese verantwortlichen Enzyms Cyclooxygenase. Indem die Acetylsalicylsäure einen Acetylrest auf ein Serin in direkter Nähe des katalytischen Zentrums überträgt, wird dem Substrat, der Arachidonsäure, der Zugang zur „Active Site“ blockiert und es resultiert Inhibition.^[17] Des Weiteren unterscheidet man zwischen Ein-Substrat- und Zwei-Substrat-Reaktionen.^[84] Wie der Name schon sagt, wird die enzymatische Umsetzung bei der Ein-Substrat-Reaktion lediglich durch ein Substrat bestimmt. Ein Beispiel für diesen Reaktionstyp stellt die in dieser Arbeit untersuchte Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP-1) dar. Diese verwendet als Substrat das Pyridiniumnukleotid NAD^+ . Bei der Zwei-Substrat-Reaktion hängt die enzymatische Umsetzung dagegen nicht nur von einem Substrat ab, sondern wird ferner durch einen Cofaktor bestimmt. Beispiele für diesen Reaktionstyp sind die beiden ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten Dehydrogenasen, Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD). In beiden Fällen dient hier das Pyridiniumnukleotid NAD(P)^+ allerdings nicht als Substrat sondern als Cofaktor. Als Substrat verwendet die ADH Ethanol und die G6PD Glucose-6-phosphat.

3.3.1 Reversible Enzymhemmung

3.3.1.1 Ein-Substrat-Reaktionen

Kompetitive Hemmung

Bei der kompetitiven Hemmung ähnelt die chemische Struktur des Inhibitors (I) der des Substrats (S).^[12, 13] Daher konkurriert dieser mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms. Eine gleichzeitige Bindung von Substrat und Inhibitor an das Enzym ist dabei nicht möglich. Da der kompetitive Inhibitor im Gegensatz zum natürlichen Substrat nicht umgesetzt werden kann, lässt sich dieser vom Substrat wieder verdrängen. Aufgrund der reversiblen Bindung von Substrat bzw. Inhibitor an das Enzym stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freiem Enzym (E), Enzym-Substrat-Komplex (ES) und Enzym-Inhibitor-Komplex (EI) ein.

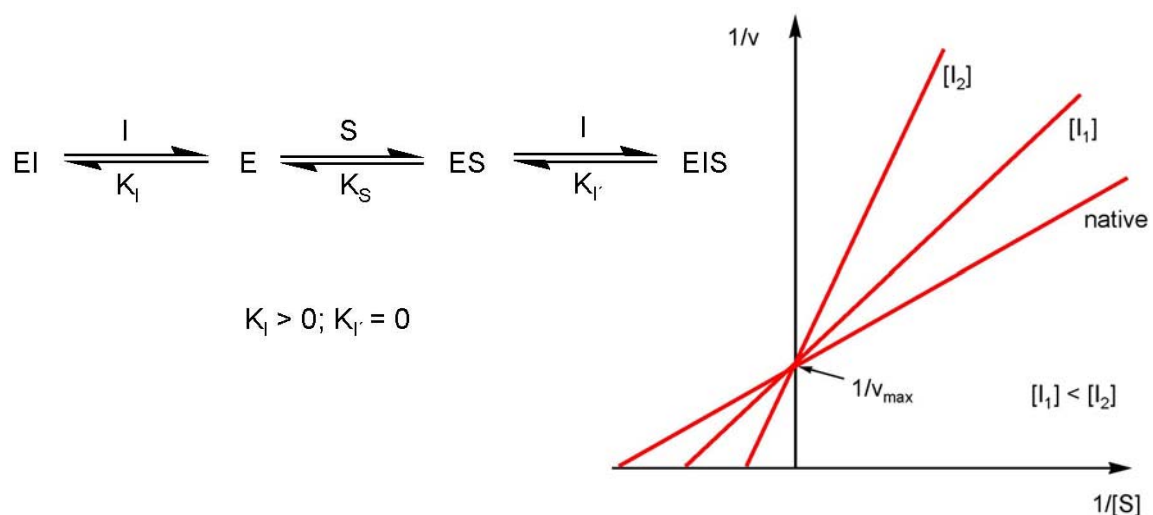


Abbildung 3.5: Modellbeschreibung und Lineweaver-Burk-Plots der kompetitiven Hemmung.

Wie man der doppeltreziproken Auftragung in Abbildung 3.5 entnehmen kann, ist die einzige Messgröße für die Enzymreaktion die Geschwindigkeit, mit der das Produkt (P) gebildet wird. Diese hängt von der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] ab. Wenn der Inhibitor (I) sehr fest an das Enzym bindet (kleiner K_I -Wert), ist nur sehr wenig freies Enzym (E) vorhanden, das mit dem Substrat (S) einen Enzym-Substrat-Komplex (ES) eingehen kann. In diesem Fall wird nur wenig Produkt gebildet, was sich in einer verlangsamtten Reaktionsgeschwindigkeit äußert. Weist der Inhibitor dagegen eine geringere Affinität zum Enzym auf (großer K_I -Wert), dann nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit nur geringfügig ab.

Eine Erhöhung der Substratkonzentration bei gleich bleibender Inhibitor-Konzentration trägt dazu bei, dass sich ES eher bildet als EI. Folglich nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit zu. Bei ausreichend hoher Substratkonzentration wird die Konzentration von EI so klein, dass die Anwesenheit des Inhibitors keinen Einfluss mehr auf die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion ausübt und die kompetitive Enzymhemmung schließlich aufgehoben ist. Des Weiteren kann man der doppeltreziproken Auftragung entnehmen, dass die Graphen in Anwesenheit des Inhibitors steiler als in dessen Abwesenheit (native Kurve) verlaufen. Ferner schneiden sich die native Gerade und die Inhibitor-Geraden auf der Ordinate im Punkt $1/v_{\max}$. Daraus folgt, dass bei unendlich hoher Substratkonzentration ($1/[S] \rightarrow 0$) die Maximalgeschwindigkeit v_{\max} gleich bleibt, unabhängig davon ob ein Inhibitor vorliegt oder nicht. Allerdings wird in Gegenwart des Inhibitors der Schnittpunkt mit der Abzisse, der zu K_m in Beziehung steht, verändert ($-1/K'_m < -1/K_m$). Bei einer einfachen kompetitiven Hemmung gilt für den Schnittpunkt mit der Abzisse:

$$-\frac{1}{K'_m} = \frac{-1}{\frac{K_m(1+[I])}{K_i}} \quad (19)$$

Aus dieser Gleichung (19) lässt sich die Inhibitionskonstante K_i errechnen. Wie bereits die K_m -Werte die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat beschreiben, geben hier die K_i -Werte die Affinität eines Enzyms zum Inhibitor an. Dabei gilt, je kleiner der K_i -Wert ist, desto potenter wirkt der Inhibitor auf das Enzym. Kompetitiv wirkende Hemmstoffe, die die Substratstruktur nachahmen und damit bestimmte Enzym-Reaktionen blockieren, finden heutzutage in der Medizin als Arzneimittel zahlreiche Anwendungen. Beispiele hierfür sind der HIV-Protease-Inhibitor Ritonavir und der ACE-Inhibitor Enalapril.^[85, 86]

Nichtkompetitive Hemmung

Bei der nichtkompetitiven Inhibition findet keine Konkurrenz zwischen Inhibitor und natürlichem Substrat um die Enzym-Bindungsstelle statt.^[12, 13] Die Bindung des Inhibitors (I), der wenig oder gar keine strukturellen Ähnlichkeiten zum Substrat (S) aufweist, erfolgt nicht im Substrat-bindenden Teil des Enzyms, dem aktiven Zentrum, sondern entweder am freien Enzym (E) oder am Enzym-Substrat-Komplex (ES). Da Inhibitor und Substrat an unterschiedlichen Stellen des Proteins binden, kann sich sowohl der Enzym-Inhibitor-

Komplex (EI) als auch der Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplex (EIS) bilden. Da letzterer langsamer zum Produkt (P) zerfällt, wird die enzymatische Reaktion zwar verlangsamt, aber nicht vollständig zum Stillstand gebracht. Abbildung 3.6 zeigt den Mechanismus sowie die Lineweaver-Burk-Plots der nichtkompetitiven Hemmung. Voraussetzung für die einfache nichtkompetitive Hemmung ist, dass die Bindung von Inhibitor an das Enzym die Affinität des Enzyms bzw. des Enzym-Inhibitor-Komplexes zum Substrat nicht ändert und durch die Bindung des Inhibitors an das Enzym keine Konformationsänderung am aktiven Zentrum hervorgerufen wird. Wie man der Lineweaver-Burk Auftragung entnehmen kann, verlaufen die Geraden in Anwesenheit des nichtkompetitiven Inhibitors steiler als in dessen Abwesenheit. Ferner schneiden sich alle Geraden mit unterschiedlicher Inhibitorkonzentration auf der Abzisse genau im Punkt $1/K_m$. Der Ordinatenschnittpunkt jeder Geraden liegt dabei im Punkt i/v_{\max} .

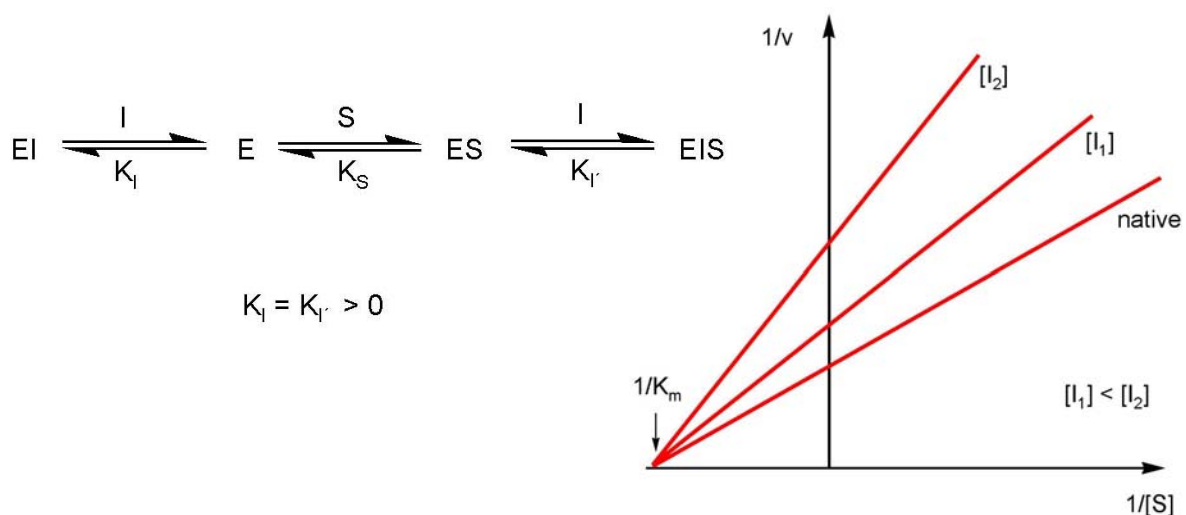


Abbildung 3.6: Modellbeschreibung und Lineweaver-Burk-Plots der nichtkompetitiven Hemmung.

Gemischte Hemmung

Der gemischte Hemm-Mechanismus, auch als „mixed inhibition“ bekannt, entspricht der nichtkompetitiven Hemmung. Dieser enthält ferner einen zusätzlichen kompetitiven Anteil. Im Gegensatz zum nichtkompetitiven Hemm-Typ sind hier die $K_{I'}$ - und K_I -Werte unterschiedlich groß. In Abbildung 3.7 sind sowohl der Mechanismus als auch die Lineweaver-Burk-Plots des gemischten Hemm-Mechanismus dargestellt.[12, 13]

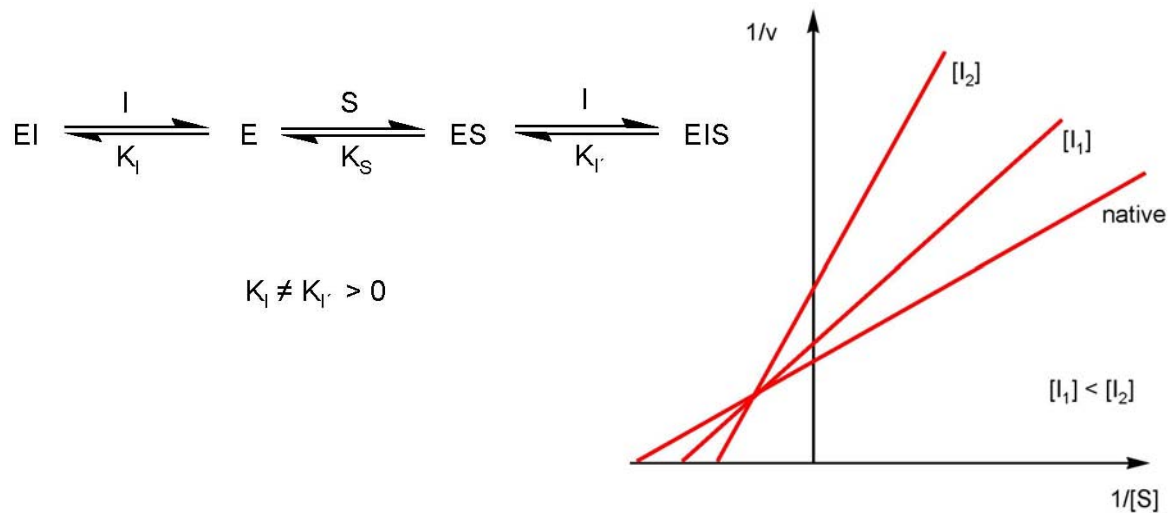


Abbildung 3.7: Modellbeschreibung und Lineweaver-Burk-Plots der gemischten Hemmung.

Unkompetitive Hemmung

Bei der unkompetitiven Hemmung handelt es sich um einen selten in der Natur vorkommenden Mechanismus, der vorwiegend bei Enzymen mit mehreren Substraten anzutreffen ist. Damit ist dieser Hemmtyp eher den Zwei-Substrat-Reaktionen zuzuordnen. In diesem Fall reagiert der Inhibitor nur mit dem Enzym-Substrat-Komplex (ES), nicht aber mit dem freien Enzym. Das Substrat kann also ungehindert an das Enzym binden. Der Mechanismus sowie die dazugehörigen Lineweaver-Burk-Plots sind der Abbildung 3.8 zu entnehmen.^[12, 13]

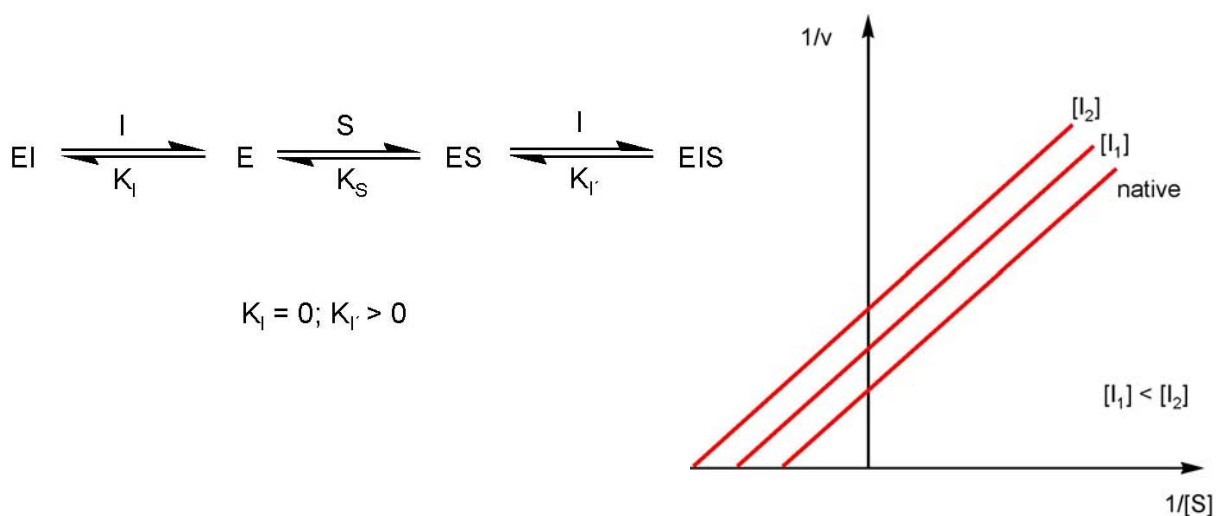


Abbildung 3.8: Modellbeschreibung und Lineweaver-Burk-Plots der unkompetitiven Hemmung.

Wie man der Lineweaver-Burk Auftragung entnehmen kann, verlaufen die Geraden bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen parallel zueinander. Sie schneiden die Ordinate konzentrationsabhängig in unterschiedlichen Punkten i/v_{\max} und die Abzisse in i/K_m .

3.3.1.2 Zwei-Substrat-Reaktionen

Im Gegensatz zu den Ein-Substrat-Reaktionen lassen sich Zwei-Substrat-Reaktionen oft mit dem „Steady-State, Sequential Ordered Model“ oder dem „Rapid-Equilibrium, Sequential Random Model“ beschreiben.^[83, 84] Während es im letzteren Fall egal ist, ob Substrat A oder Substrat B zuerst an das freie Enzym (E) bindet, spielt die Reihenfolge für das „Steady-State, Sequential Ordered Model“ eine entscheidende Rolle. Im Fall der Alkohol-Dehydrogenase muss zuerst der Cofaktor an die „Active Site“ binden, durch dessen Bindung eine Konformationsänderung induziert wird. Auf diese Weise wird die „Rossmann-Spalte“ geschlossen und dadurch der Zugang des Substrats zur „Active Site“ erst ermöglicht.^[87] Für die enzymatische Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ist dagegen die Reihenfolge der Substratbindung nicht entscheidend. Sie folgt daher dem „Rapid-Equilibrium, Sequential Random Model“

3.3.2 Irreversible Enzymhemmung

Bei der irreversiblen Enzymhemmung bindet der Inhibitor irreversibel an das Enzym, so dass das Enzym für immer inaktiv bleibt. Dies kann z. B. durch Ausbildung einer kovalenten Bindung oder durch Oxidation entstehen. Zu diesen so genannten Enzymgiften zählen unter anderem Schwermetallionen (Ag^+ , Hg^+), sowie Oxidationsmittel. Da diese Inhibitoren keine strukturelle Ähnlichkeit zum Substrat zeigen, lässt sich die Hemmung auch mit zunehmender Substratkonzentration nicht mehr rückgängig machen. Suizidinhibitoren stellen eine weitere wichtige Klasse der irreversiblen Enzymhemmung dar. Diese Hemmstoffe werden im aktiven Zentrum des Enzyms unter Ausbildung einer kovalenten Zwischenstufe umgesetzt. Da dieses Intermediat nicht wie ein gewöhnliches Produkt abdissoziiert, blockiert es dadurch das Enzym für weitere Reaktionen. Wegen ihrer geringen Reaktivität außerhalb des aktiven Zentrums und ihrer hohen Spezifität gegenüber wichtigen metabolischen Enzymen finden Suizidinhibitoren oft Einsatz in der Krebsbehandlung. Ihre Zielenzyme sind oft Glutamin-

Amido-Transferasen, die für die Nukleotid-Biosynthese verantwortlich sind und höchst effektiv durch Glutaminanaloga wie Azaserin gehemmt werden.^[88] Statt auf die Amidogruppe des natürlichen Substrats Glutamin trifft das Enzym in Gegenwart des Suizidinhibitors Azaserin auf dessen Diazogruppe. Diese wird unter Freisetzung von Stickstoff kovalent mit dem Enzym verknüpft und dadurch die enzymatische Reaktion blockiert. Ein weiterer wichtiger Vertreter der Klasse der Suizidinhibitoren ist das Penicillin.^[13] Die Wirkungsweise von Penicillin besteht darin, über seinen geöffneten β -Lactam-Ring die Zellwandsynthese wachsender Bakterien zu blockieren, durch die deren Absterben beschleunigt wird.

3.3.3 Partielle Enzymhemmung

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der Enzym-Inhibitionen betrifft das jeweilige Ausmaß der Hemmung. Laut Literatur wird generell zwischen einer vollständigen und einer partiellen Enzyminhibition unterschieden.^[89, 90] Diese werden oft auch als lineare und hyperbolische Inhibition bezeichnet, da die Auftragung der reziproken Geschwindigkeit gegen die InhibitorKonzentration entweder eine gerade Linie oder eine Hyperbel ergibt. Bei der vollständigen Enzymhemmung kommt es zu der Bildung eines so genannten „Dead-End“-Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI) oder eines unproduktiven Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes (EIS) oder beider. In diesem Fall nähert sich die Geschwindigkeit mit zunehmender InhibitorKonzentration dem Wert Null an. Liegt dagegen eine partielle Enzymhemmung vor, bildet sich kein „Dead-End“-Enzym-Inhibitor-Komplex (EI). Stattdessen zerfällt der Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex (EIS) unter Bildung des Produktes mit deutlich verlangsamter Geschwindigkeit. Das allgemeine Schema der partiellen Enzyminhibition ist in der Abbildung 3.9 dargestellt. Ob eine partielle Enzyminhibition vorliegt, lässt sich allerdings mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Plots nicht nachweisen. Nach Whiteley kann der Unterschied zwischen vollständiger und partieller Enzyminhibition nur durch die Auftragung der partiellen Geschwindigkeit $[v/V_0 - v]$ gegen die reziproke InhibitorKonzentration $(1/[I])$ bei verschiedenen Substratkonzentrationen festgestellt werden.^[89] Dabei ist v die Reaktionsgeschwindigkeit in Anwesenheit des Inhibitors und V_0 die Geschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors bei einer bestimmten Substratkonzentration. Die Beziehungen, die sich aus dem Schnittpunkt der Geraden, der Geradensteigung und der Substratkonzentration ergeben, charakterisieren den jeweiligen Hemm-Typ.

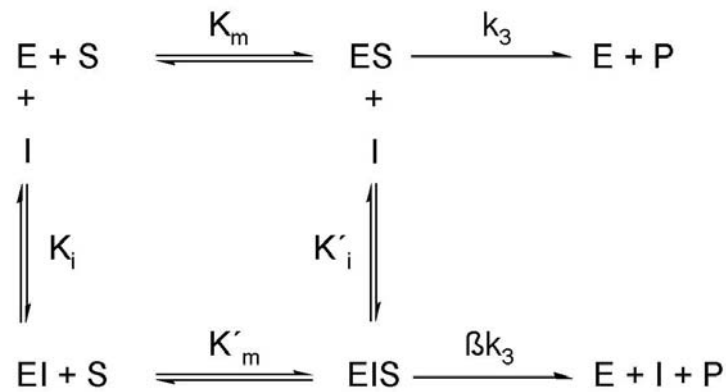


Abbildung 3.9 : Allgemeines Schema einer partiellen Enzyminhibition. K_m : Michaelis-Konstante für die Substrat-Bindung an das Enzym; K'_m : Michaelis-Konstante für die Substrat-Bindung an den Enzym-Inhibitor-Komplex; K_i , K'_i : jeweilige Inhibitorkonstanten; β : Faktor für den partiellen Verlauf der Inhibition.

Für den Fall, dass sich die Geraden im Ursprung schneiden, liegt eine vollständige Inhibition vor. Befindet sich dagegen der Schnittpunkt vom Ursprung entfernt auf der Abszisse, dann liegt eine partielle Inhibition vor. Gleichzeitig lassen sich anhand der Geradensteigung dieser Auftragungen partiell kompetitive, partiell nichtkompetitive, partiell unkompetitive und partiell gemischte Hemmung voneinander unterscheiden. Die partiell gemischte Hemmung stellt dabei eine Mischung aus partiell kompetitiver und vollständig nichtkompetitiver Hemmung dar. Im Fall der partiell kompetitiven Hemmung bindet das Substrat stärker an das freie Enzym als an den EI-Komplex, wobei beide Komplexe ES und EIS das Produkt mit gleicher Geschwindigkeit freisetzen. Sowohl in diesem Fall, als auch im Fall der partiell gemischten Hemmung nimmt dabei die Steigung der Geraden mit zunehmender Substratkonzentration zu. Bei der nichtkompetitiven Hemmung binden Substrat und Inhibitor an völlig unterschiedliche Seiten des Enzyms ohne sich dabei gegenseitig zu beeinflussen. Im Gegensatz zur vollständig nichtkompetitiven Hemmung ist bei der partiell nichtkompetitiven Hemmung der EIS-Komplex nicht unaktiv, sondern kann auseinander dissoziieren. Die Produktfreisetzung erfolgt allerdings deutlich langsamer als im Fall des ES-Komplexes. Ferner bleibt die Steigung der Geraden bei der partiell nichtkompetitiven Hemmung unabhängig von der Substratkonzentration stets konstant. Bei der unkompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor nicht an das freie Enzym, sondern nur an den ES-Komplex. Im Gegensatz zur partiell kompetitiven Hemmung nimmt hier die Steigung der Geraden mit zunehmender Substratkonzentration ab.

4 Durchführung

4.1 Synthese der wasserlöslichen Rezeptormoleküle **606**, **622**, **734** und **750** sowie der Modellverbindungen **406** und **422**

Bevor mit den enzymatischen Untersuchungen begonnen werden konnte, mussten zunächst die vier bereits bekannten wasserlöslichen Rezeptormoleküle, die beiden Clips **606** und **622**, sowie die beiden Tweezers **734** und **750**, resynthetisiert werden. Um später zeigen zu können, welche essentielle Bedeutung den Seitenwänden bzw. der Kavität der molekularen Clips und Tweezer bei der molekularen Erkennung und der daraus resultierenden Enzymhemmung beizumessen ist, wurden in diesem Zusammenhang auch die beiden Modellverbindungen, Spacer **406** und Spacer **422** ohne Seitenwände synthetisiert. Alle Verbindungen, die in den folgenden Enzym-Assays auf ihre inhibitorischen Fähigkeiten getestet wurden, sind in der folgenden Abbildung 4.1 zusammengefasst.

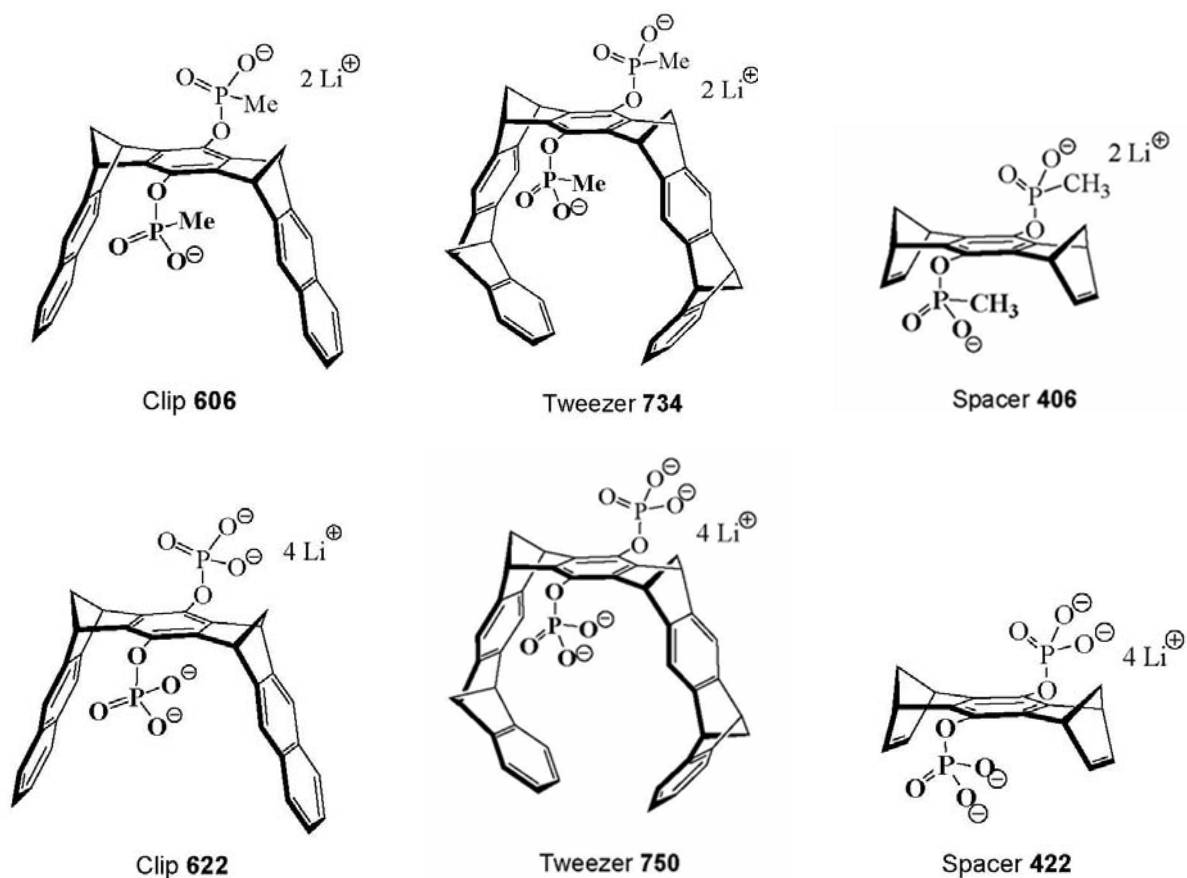


Abbildung 4.1: Übersicht der vier Rezeptormoleküle Clip **606**, Clip **622**, Tweezer **734** und Tweezer **750** sowie der beiden Modellverbindungen Benzol-Spacer **406** und Benzol-Spacer **422**.

4.1.1 Synthese der zentralen Benzol-, „Spacereinheit“

Alle vier Rezeptormoleküle besitzen die zentrale Benzol-, „Spacereinheit“ als gemeinsamen Gerüstbaustein. An diesen können verschiedene Seitenarme anneliert werden. Die Synthese dieses Diacetoxybenzol-Spacers umfasst insgesamt vier Reaktionsschritte.^[71, 72, 91] Der erste Syntheseschritt beinhaltet eine Diels-Alder-Reaktion von *p*-Benzochinon (**1S**) mit frisch destilliertem Cyclopentadien (**2S**) unter Bildung des 1:1-Addukts **3S**. Dieses wird unter Basenkatalyse zunächst zum Hydrochinonsystem **4S** enolisiert und anschließend mit *p*-Benzochinon (**1S**) zum Chinon **5S** oxidiert. Es folgt eine weitere Diels-Alder-Reaktion mit frisch destilliertem Cyclopentadien (**2S**) unter Bildung eines Isomerengemisches bestehend aus *syn*- und *anti*-**6S**. Mit Hilfe fraktionierender Kristallisation lässt sich mehr als 95%ig reines *syn*-**6S** gewinnen. Dieses wird schließlich durch Enolisierung und Acetylierung in das Bisdienophil **7S** überführt. Der Syntheseweg des Bisdienophils **7S** ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

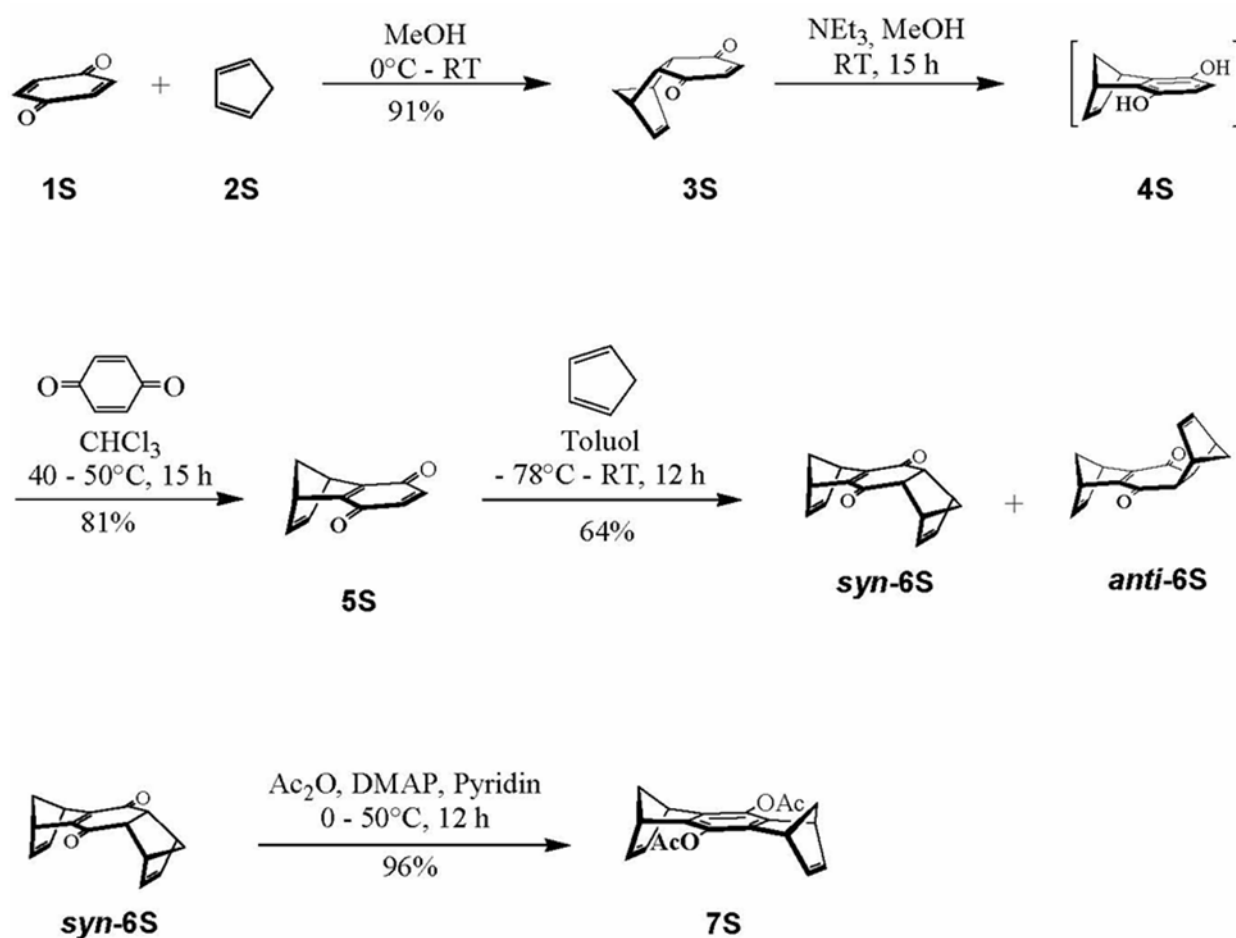


Abbildung 4.2: Syntheschema der zentralen Benzol-, „Spacereinheit“ **7S**.

4.1.2 Synthese der wasserlöslichen Phosphonat- und Phosphat-substituierten Clips **606** und **622**

Die Synthese der beiden molekularen Clips **606** und **622** geht auf die von Cava *et al.* entwickelten und von Paddon-Row *et al.* später angewendeten Methode zur Annelierung von Naphthalin an Norbornadien-Systeme zurück.^[92-94] Der vollständige Syntheseweg ist den Abbildungen 4.2 bis 4.6 zu entnehmen. Der erste Reaktionsschritt beinhaltet zunächst eine Finkelstein-Reaktion des $\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ -Tetrabrom-*o*-xylols (**8S**) in Gegenwart von Natriumiodid unter Bildung des *o*-Chinodimethans **9S**. Dieses unterliegt einer elektrocyclischen Ringschlussreaktion unter Bildung von Dibrombenzocyclobuten (**10S**). In Gegenwart des Bisdienophils **7S** wird allerdings das *o*-Chinodimethan (**9S**) in einer Diels-Alder-Reaktion abgefangen.^[71, 72, 91] Dabei reagieren beide Norbornen-Doppelbindungen mit **9S** unter Bildung des Tetrabrombisaddukts **11S**. Aufgrund dessen Instabilität unter den gegebenen Reaktionsbedingungen bildet sich nach vierfacher HBr-Eliminierung das Grundgerüst der beiden Clips mit zentraler Diacetoxybenzol-„Spacereinheit“ **12S**. Der nächste Reaktionsschritt beinhaltet die basenkatalysierte Hydrolyse unter Bildung des Hydrochinon-Clips **13S**. Durch den Zusatz von Phenylhydrazin soll eine Oxidation des Hydrochinon-Clips zum Chinon-Clip verhindert werden. Dieser Hydrochinon-Clip dient nun als Ausgangsprodukt für die Synthese der beiden Clips **606** und **622**.

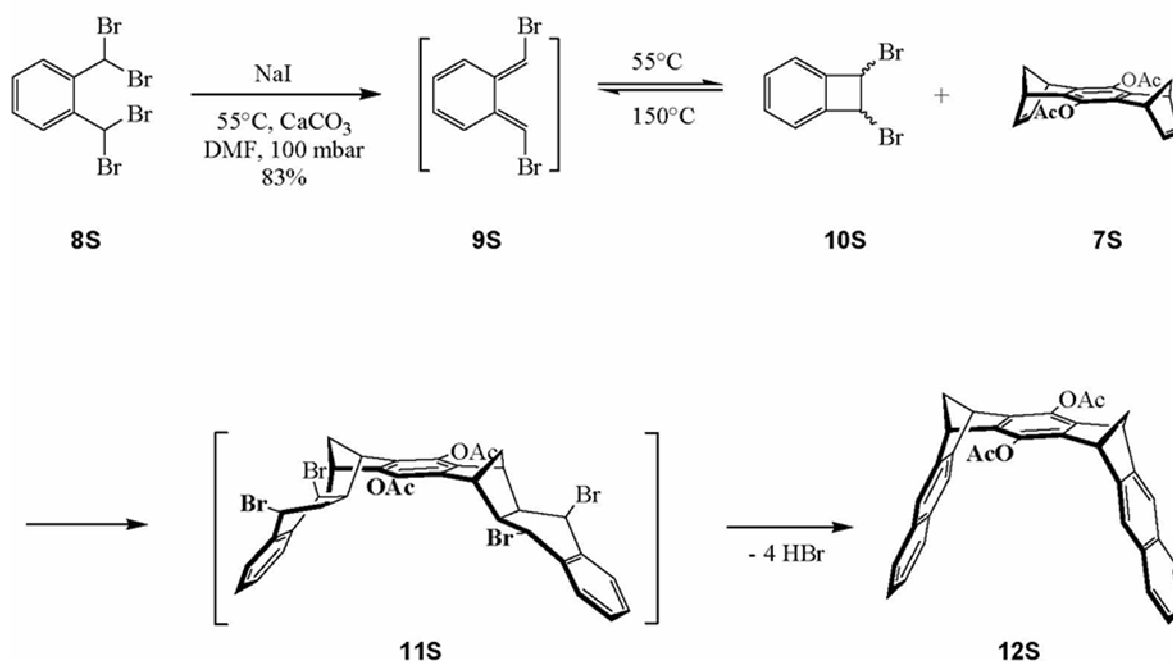


Abbildung 4.3: Syntheschema des Clips **12S** mit zentraler Diacetoxybenzol-„Spacereinheit“.

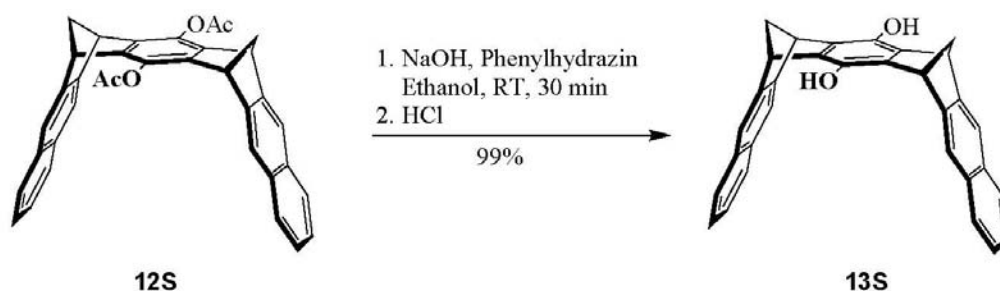


Abbildung 4.4: Syntheschema des Hydrochinon-Clips **13S**.

Bei der Synthese des Clips **606** wird die Phosphorylierung des Hydrochinon-Clips **13S** in Gegenwart des Phosphorylierungsreagenz Dichlormethylphosphonsäure und Triethylamin durchgeführt. Die Hydrolyse des Säurechlorids **14S** ergibt die freie Säure des Phosphonat-substituierten Clips **15S**. Die anschließende Behandlung mit zwei Moläquivalenten Lithiumhydroxid-Monohydrat in Methanol liefert letztendlich den Phosphonat-substituierten Clip **606** als Bislithiumsalz.^[74]

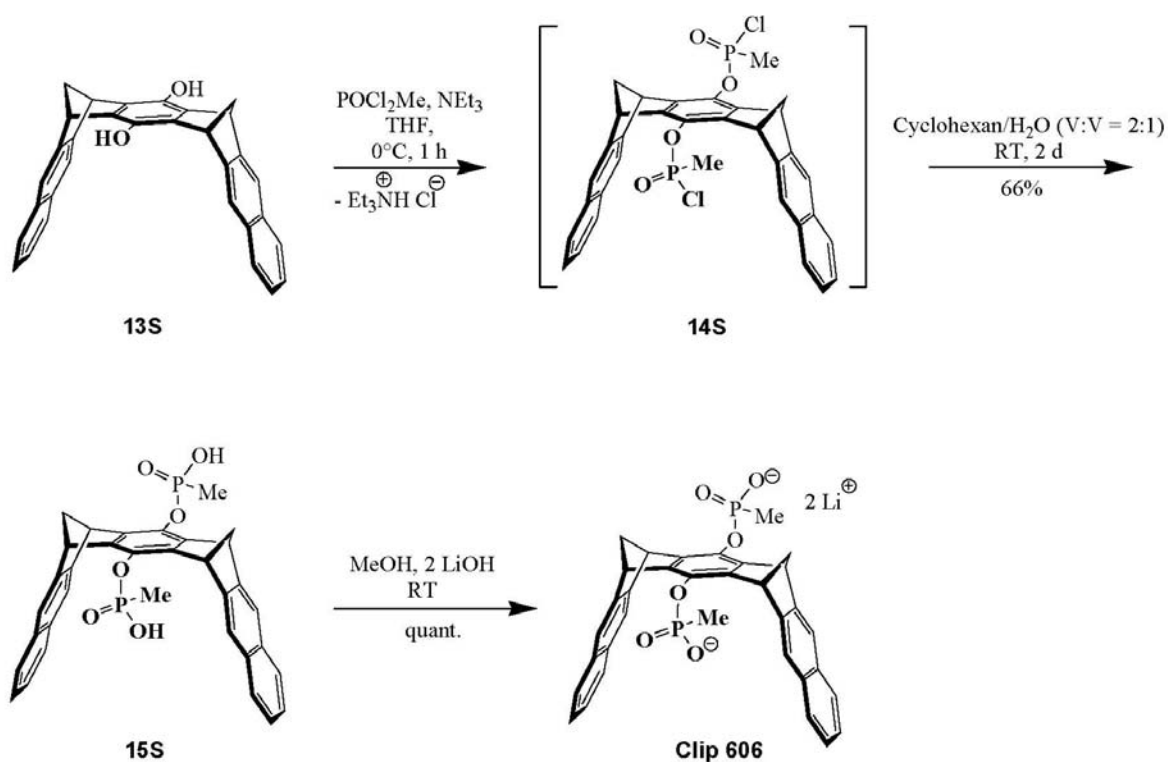


Abbildung 4.5: Syntheschema des Phosphonat-substituierten-Clips **606**.

Bei der Synthese des Clips **622** erfolgt die Phosphorylierung des Hydrochinon-Clips **13S** in Gegenwart eines großen Überschusses an Phosphoroxychlorid (14 Moläquivalente) und 2.7 Moläquivalenten Triethylamin. Dieser große Überschuss an Phosphoroxychlorid dient der Unterbindung oligomerer bzw. polymerer Nebenprodukte. Das entstandene Säurechlorid **16S** wird anschließend zum Phosphorsäure-substituierten Clip **17S** hydrolysiert. Durch Zugabe von vier Moläquivalenten Lithiumhydroxid-Monohydrat in Methanol ergibt sich schließlich der wasserlösliche Phosphat-substituierte Clip **622** als Tetralithiumsalz.^[79]

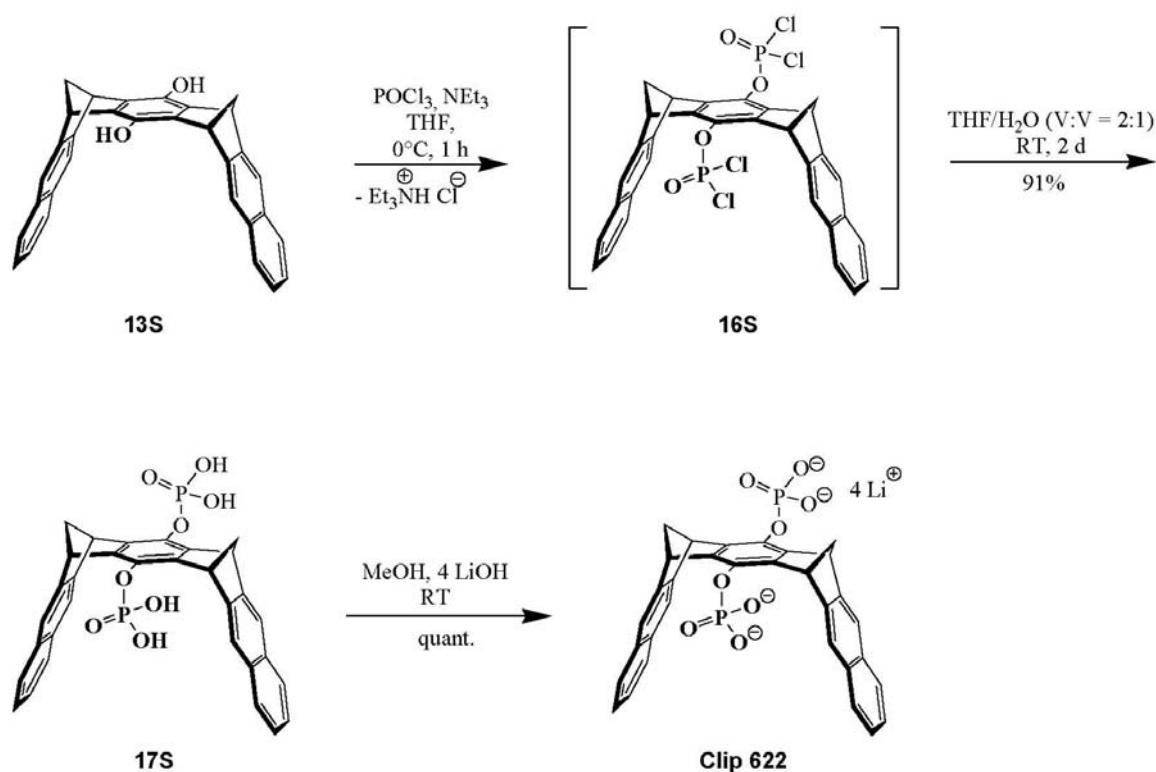


Abbildung 4.6: Syntheschema des Phosphat-substituierten Clips **622**.

4.1.3 Synthese der wasserlöslichen Phosphonat- und Phosphat-substituierten Tweezers **734** und **750**

Für die Synthese der beiden Tweezers **734** und **750** werden zwei molekulare Bausteine benötigt, das bereits bei der Clip-Synthese verwendete Bisdienophil **7S** (Abbildung 4.2) und das Dien **26S**.

Die Synthese des Diens **26S** umfasst sechs Syntheseschritte.^[66, 67, 95, 96] Diese sind in der Abbildung 4.7 ausführlich dargestellt. Im ersten Reaktionsschritt erfolgt bei hoher Temperatur zunächst eine sigmatrope 1,5-H-Verschiebung des Indens (**18S**) unter Bildung des Isoindens (**19S**). Dieses wird von Maleinsäureanhydrid (**20S**) als Dienophil in einer Diels-Alder-Reaktion unter Bildung des 1:1-Adduktes **21S** abgefangen. Der zweite Reaktionsschritt sieht eine säurekatalysierte Methanolyse vor, die den *cis*-Diester **22S** liefert. Durch basen-katalysierte Epimerisierung ergibt sich schließlich der *trans*-Diester **23S**. Dieser wird mit Lithiumtetrahydroaluminat zum *trans*-Diol **24S** reduziert. Die Umsetzung mit dem Chlorierungsreagenz Triphenylphosphindichlorid liefert schließlich das *trans*-Dichlorid **25S**. Der letzte Reaktionsschritt führt über eine zweifache basische Eliminierung mit Kaliumhydroxid zum gewünschten Dien **26S**.

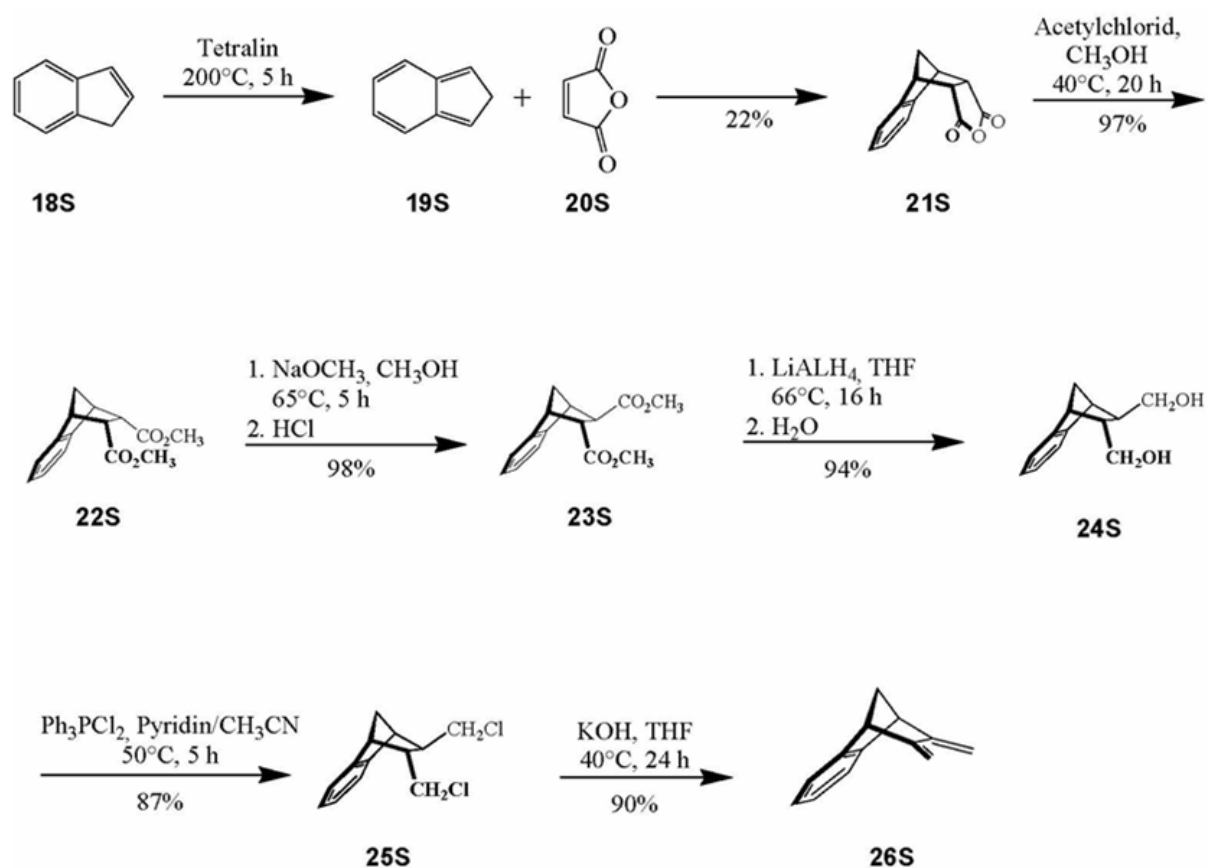


Abbildung 4.7: Syntheschema des für die Tweezer-Synthese benötigten Diens **26S**.

Das Grundgerüst des Tweezers ergibt sich aus der Diels-Alder-Reaktion des Diacetoxybenzol-Spacers **7S** mit zwei Moläquivalenten des Diens **26S**. Da die Diels-Alder-Reaktion hoch stereoselektiv *exo* bzgl. **7S** und *endo* bzgl. **26S** verläuft, entsteht ausschließlich die Verbindung **27S** mit *syn* zueinander ausgerichteten Methylenbrücken. Anschließende Dehydrierung mit DDQ liefert den acetoxysubstituierten Tweezer **28S**, der in Gegenwart von Lithiumaluminiumhydrid zum Hydrochinon-Tweezer **29S** hydrolysiert werden kann (Abbildung 4.8).^[66, 80]

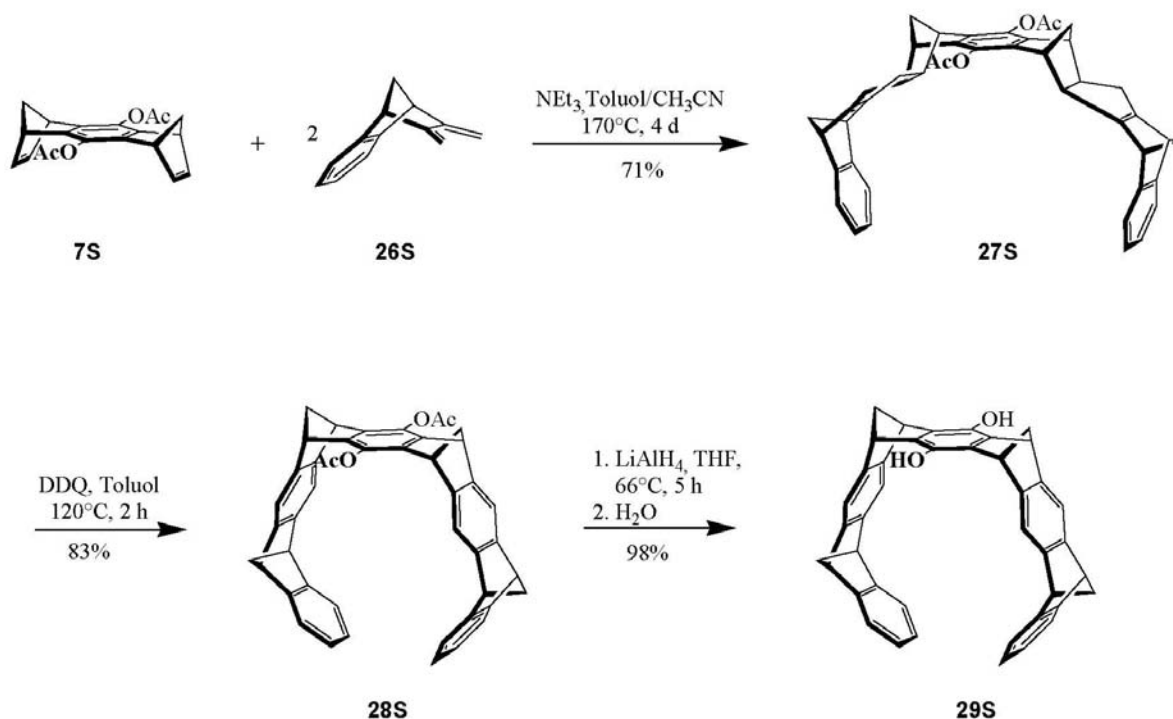
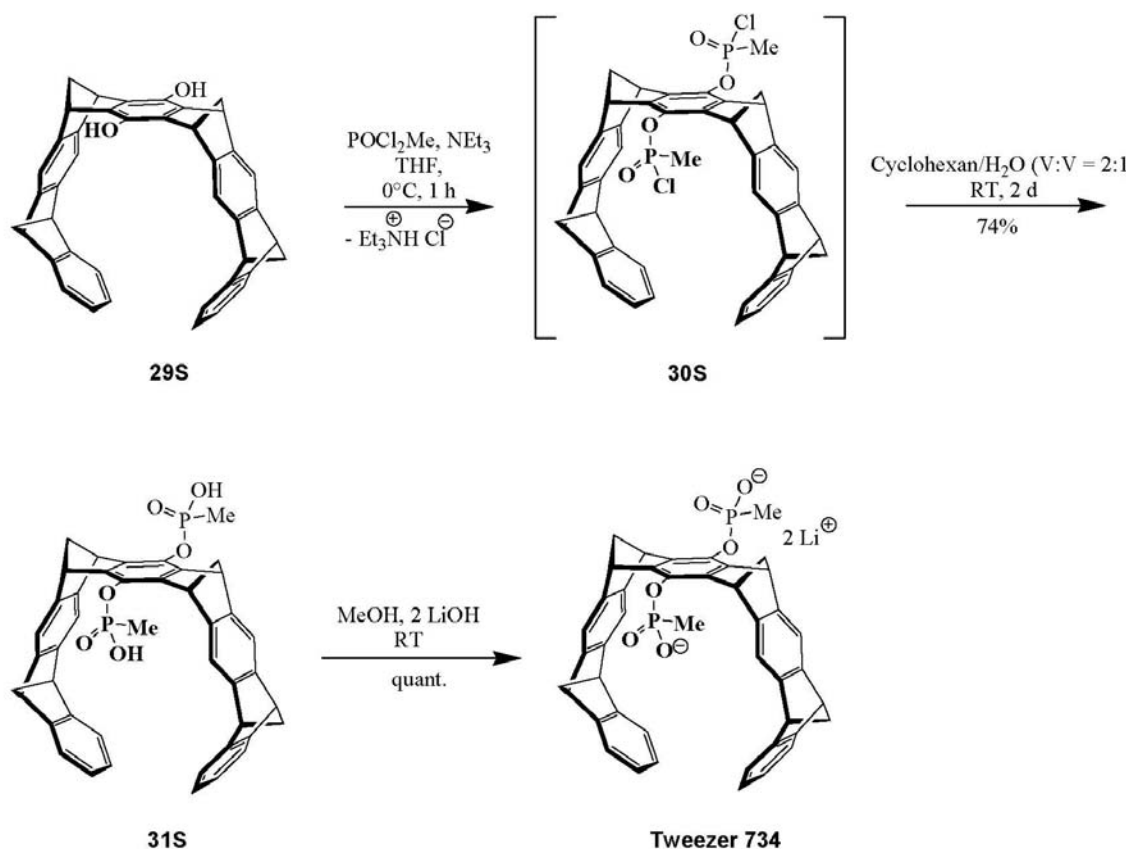
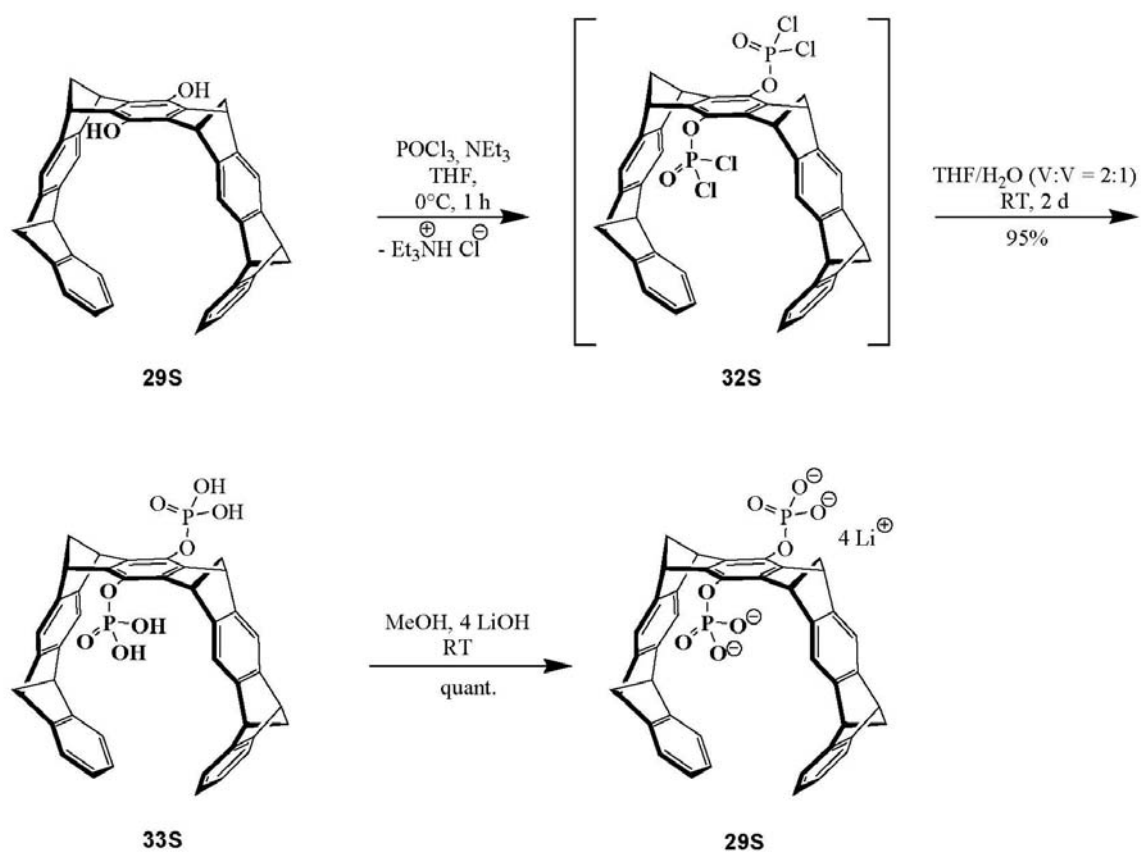


Abbildung 4.8: Syntheschema des Hydrochinon-Tweezers **29S**.

Die Synthese der freien Phosphorsäure **31S** und Phosphonsäure **33S** über die entsprechenden Säurechloride **32S** und **32S** ausgehend vom Hydrochinon-Tweezer **29S** erfolgte analog zu der der beiden Clips **15S** und **17S**. Gleiches gilt auch für die Überführung dieser beiden Verbindungen **31S** und **33S** in die entsprechenden Bis- und Tetralithiumsalze der Phosphonat- und Phosphat-Tweezer **734** (Abbildung 4.9) und **750** (Abbildung 4.10).^[79] Damit wurde für den Phosphonat-substituierten Tweezer **734** ein neuer Syntheseweg beschritten, ohne dass eine Demethylierung mit Lithiumbromid erforderlich war.^[75]

Abbildung 4.9: Syntheschema des Phosphonat-substituierten-Tweezers **734**.Abbildung 4.10: Syntheschema des Phosphat-substituierten-Tweezers **750**.

4.1.4 Synthese der beiden Modellverbindungen Phosphonat- und Phosphat-substituierter Benzol-Spacer 406 und 422

Als Grundgerüst dieser beiden Modellverbindungen dient das Hydrochinonsystem **34S**, dessen Synthese in Abbildung 4.11 dargestellt ist. Dieses ergibt sich durch basische Hydrolyse der Diacetoxybenzol-, „Spacereinheit“ **7S** mit Natriumhydroxid.^[71]

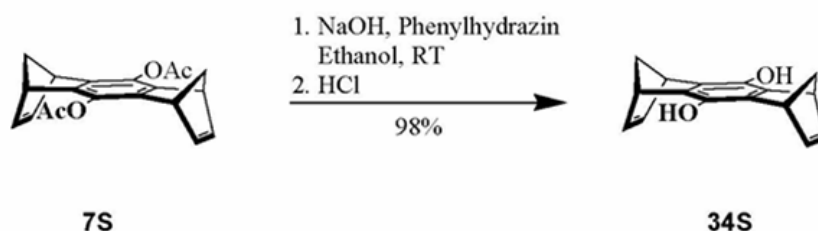


Abbildung 4.11: Syntheschema der Hydrochinonbenzol-, „Spacereinheit“ **34S**.

Die Synthese des Phosphonat-substituierten Benzol-Spacers **406** erfolgt analog zu der des Phosphat-substituierten Clips **606** als Bislithiumsalz. Die einzelnen Syntheseschritte sind der Abbildung 4.12 zu entnehmen.^[79]

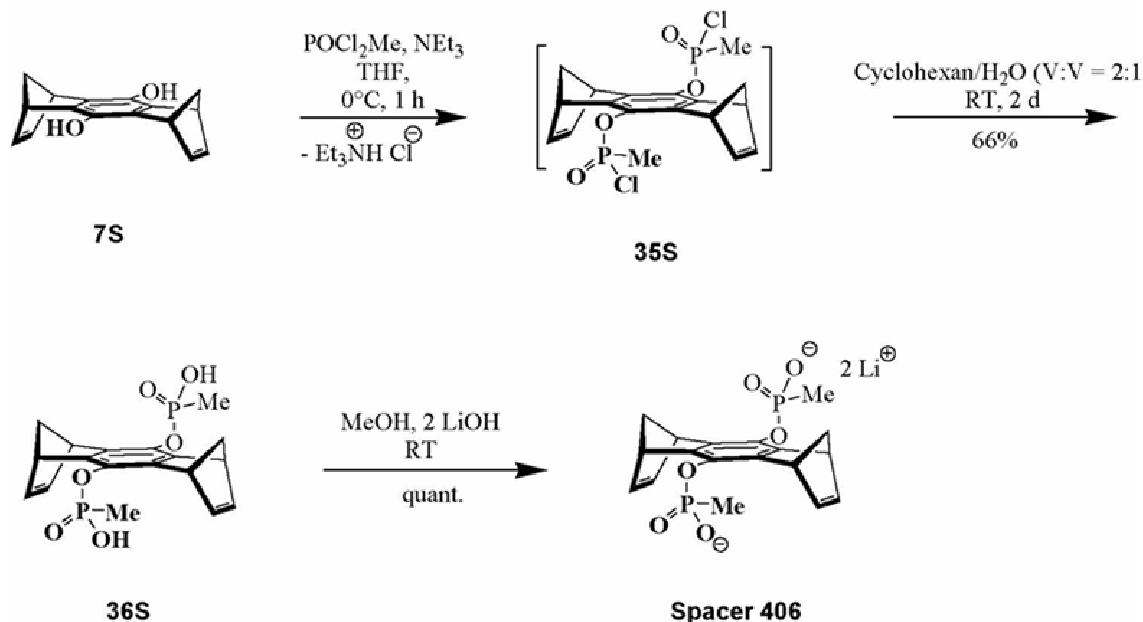


Abbildung 4.12: Syntheschema des wasserlöslichen Phosphonat-substituierten Benzol-Spacers **406**.

Im Gegensatz zum Phosphonat-substituierten Benzol-Spacer **406** erfolgt die Darstellung des Phosphat-substituierten Benzol-Spacers **422** als Tetralithiumsalz über das Phosphorsäurechlorid **37S** direkt durch Umsetzung mit Lithiumhydroxidmonohydrat in einer THF/H₂O-Mischung (v/v = 1:1). Dieser Reaktionsschritt ist in der Abbildung 4.13 dargestellt.

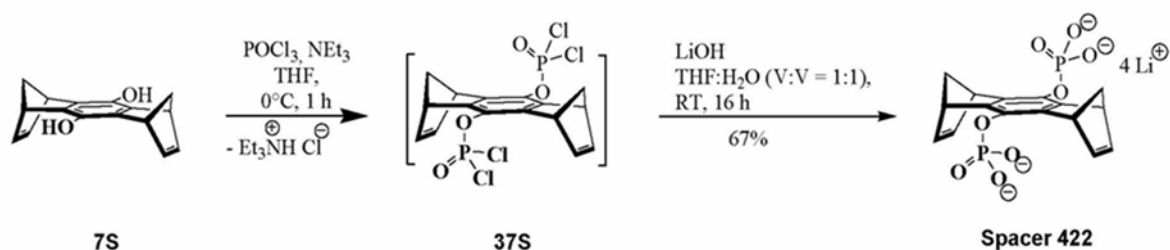


Abbildung 4.13: Syntheschema des wasserlöslichen Phosphat-substituierten Benzol-Spacers **422**.

Nachdem alle Rezeptormoleküle und Modellverbindungen resynthetisiert waren, konnte mit den enzymkinetischen Untersuchungen begonnen werden.

Als erstes Enzym wurde die Alkohol-Dehydrogenase (ADH) untersucht.

4.2 Alkohol-Dehydrogenase (ADH)

4.2.1 Charakterisierung der ADH

Zu der Familie der Alkohol-Dehydrogenasen gehören insgesamt 47 Mitglieder.^[97-100] Alle stammen vom gleichen Ursprungsgen ab, haben sich aber im Laufe der Evolution unterschiedlich entwickelt. Nach Aufklärung ihrer Primärstrukturen können vier verschiedene Gruppen dieser ADH-Familie identifiziert werden. Die Einteilung der ADH-Mitglieder erfolgt in die Gruppen der Wirbeltiere, Pflanzen, eukaryotischen Mikroorganismen und prokaryotischen Bakterien. Im menschlichen Körper kommt ADH in mindestens neun leicht verschiedenen Formen vor. Hohe Konzentrationen an ADH lassen sich sowohl in der Leber als auch in der Magenschleimhaut finden.^[12, 13] Alkohol-Dehydrogenasen sind zinkhaltige Oxidoreduktasen, die in Gegenwart des Cofaktors NAD^+ primäre und sekundäre Alkohole zu ihren entsprechenden Aldehyden oder Ketonen reversibel oxidieren. So reduziert z. B. die Alkohol-Dehydrogenase in der Netzhaut des Auges den beim Sehvorgang entstandenen Vitamin-A-Aldehyd (*all-trans*-Retinal) zum Retinol, das die Voraussetzung zur Resynthese des Sehpigmentes bildet. Auf dieselbe Weise beseitigt die ADH in der Leber das in die Blutbahn gelangte Ethanol. Baker's Yeast Alkohol-Dehydrogenase (*Saccharomyces cerevisiae*) ist ein Mitglied der dritten Gruppe und gehört zu den ersten Proteinen, die jemals gereinigt und isoliert wurden. In Baker's Yeast kommen insgesamt drei Isoenzyme vor (YADH-1, YADH-2 und YADH-3), von denen YADH-1 dominiert.^[98, 101] Yeast Alkohol-Dehydrogenase ist ein Tetramer aus vier gleichen Untereinheiten. Jede dieser vier identischen Untereinheiten besteht aus einer einzelnen Polypeptid-Kette mit 347 Aminosäuren und besitzt eine molare Masse von ca. 35 kDa. Damit ergibt sich für YADH-1 als Tetramer ein Molekulargewicht von insgesamt 141 kDa. Des Weiteren befinden sich in jeder Untereinheit eine Cofaktor-Bindungsstelle („Active Site“) sowie zwei Zink-Ionen. Von diesen beiden Zink-Ionen ist allerdings nur eines für die katalytische Aktivität essentiell. Das andere Zink-Ion übernimmt dagegen ausschließlich koordinative Funktionen. Das katalytisch aktive Zinkzentrum, das von einem Cys-His-Cys-Motiv koordiniert wird (Abbildung 4.15), befindet sich am Grund einer tiefen Tasche und ist durch zwei Kanäle von der Proteinoberfläche aus zugänglich. Wie man der Abbildung 4.14 entnehmen kann, gelangt der Cofaktor durch den einen Kanal in die Nähe des aktiven Zentrums der ADH. Der andere noch freie Kanal ist Substratmolekülen wie z. B. Ethanol vorbehalten. Allerdings ragt der Pyridinring des Cofaktors noch tief bis in diesen zweiten Kanal hinein.^[98, 101, 102]



Abbildung 4.14: Schematische Darstellung der „Active Site“ der ADH. Der Nikotinamidring des Cofaktors ragt bis in den zweiten Kanal hinein. Sowohl das Sauerstoff-Atom des Substrats Ethanol als auch das Stickstoff-Atom des Nikotinamidrings des Cofaktors NAD^+ sind an das katalytisch aktive Zinkatom Zn 1376 gebunden.^[102]

Jede dieser vier Untereinheiten der YADH lässt sich in zwei unterschiedlich große Bereiche unterteilen: die katalytische Domäne und die Coenzym-Bindungs-Domäne. Die katalytische Domäne umfasst 3/5 und die Coenzym-Bindungs-Domäne 2/5 aller vorhandenen Aminosäuren.^[98] Während die katalytische Domäne sowohl dem katalytisch aktiven Zinkzentrum als auch den meisten für die Substratspezifität verantwortlichen Gruppen Liganden zur Verfügung stellt, bindet die Coenzym-Bindungs-Domäne den Cofaktor NAD^+ .^[103] Beide Domänen sind durch eine Spalte voneinander getrennt, die eine tiefe Bindungstasche beinhaltet. In dieser Bindungstasche werden das Substrat und die Nikotinamid-Hälfte des Cofaktors gebunden. Die innere Seite der Substrat-Bindungstasche enthält die hydrophoben Aminosäurenreste Trp-57, Trp-93, Asn-110, Leu-132, Tyr-140, Thr-141, Met-294, Ala-296 und Ile-318, die sich alle in derselben Untereinheit wie die Zink-Liganden befinden. Durch die beiden voluminösen Aminosäurenreste Trp-93 und Trp-57 wird der Zugang der Substrat-Bindungstasche der YADH deutlich stärker verengt, als im Fall der entsprechenden Pferdeleber-Substrat-Bindungstasche. Dies erklärt die weitaus engere Substratspezifität der YADH im Vergleich zur Pferdeleber ADH, die zudem nicht als Tetramer, sondern als Dimer vorliegt.^[104] YADH metabolisiert ausschließlich primäre unverzweigte aliphatische Alkohole wie z. B. Ethanol. Sekundäre sowie jegliche vernetzte Alkohole mindern deutlich ihre enzymatische Aktivität. Der Abbau primärer aliphatischer unverzweigter Alkohole, insbesondere Ethanol, erfolgt im menschlichen Körper in zwei

Schritten. In der Abbildung 4.16 ist der erste Reaktionsschritt detailliert dargestellt. Dieser beinhaltet die reversible Oxidation des Ethanols durch die Alkohol-Dehydrogenase zu Acetaldehyd. Da dieses Zwischenprodukt stark toxisch wirkt, wird es im zweiten Reaktionsschritt von einem anderen Enzym, der Aldehyd Dehydrogenase rasch zum Acetat weiter oxidiert. Das resultierende Acetat dient dem Organismus als Baustein für neue Moleküle. Da das Zink-Ion selbst über keine Redoxeigenschaften verfügt, wird für die Oxidation des Alkohols ein redoxaktiver Cofaktor benötigt. Diesen Zweck erfüllt das NAD^+/NADH -System. Während der Cofaktor NAD^+ in die reduzierte Form NADH überführt wird, erfolgt im Gegenzug die Oxidation des primären Alkohols zum Aldehyd. Der entscheidende Schritt dieser Reaktion ist die stereoselektive Übertragung eines Hydrid-Ions vom Substratmolekül auf den Nikotinamidring des Cofaktors NAD^+ . Dass ein Enzym zwischen zwei enantiotopen Wasserstoffatomen unterscheiden kann, wurde erstmals im Jahre 1953 von Westheimer *et al.* anhand der Alkohol-Dehydrogenase gezeigt. Das katalytisch aktive Zink-Ion übernimmt dabei zunächst die für die stereospezifische Hydridübertragung notwendige räumliche Fixierung des alkoholischen Substrats. Durch diese Fixierung wird der pK_a -Wert des Substrats gesenkt und dadurch die Deprotonierung des Alkohols erleichtert. Des Weiteren trägt die durch das katalytisch aktive Zinkatom hervorgerufene Substratorientierung zu einer streng stereospezifisch ablaufenden Reaktion bei. Wie in der Abbildung 4.15 dargestellt ist, kann aufgrund der fixierten Orientierung von Cofaktor und Substrat lediglich das Substrat-Wasserstoff-Atom (H-6902), das sich auf der Seite des Cofaktors befindet, als Hydrid-Ion übertragen werden. Der Abstand zum C(4)-Zentrum des Pyridinringes beträgt dabei 2.93 \AA .^[102]

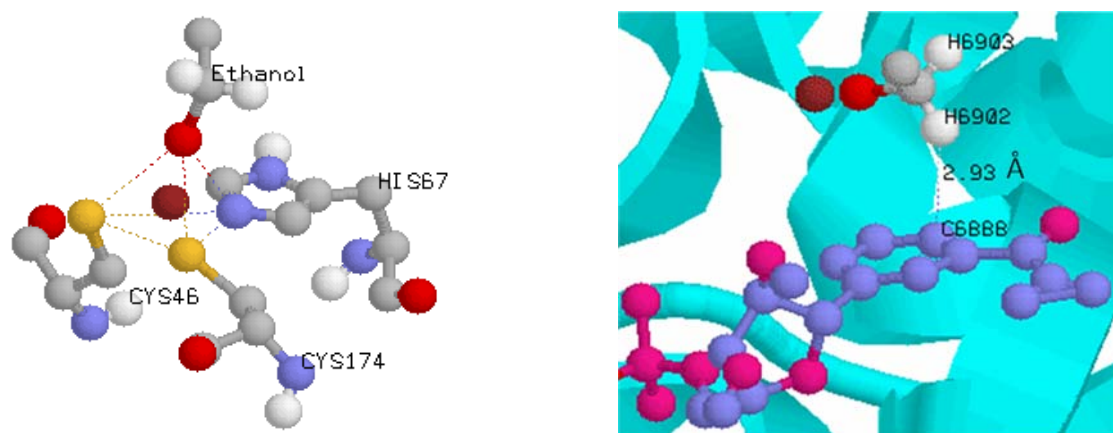


Abbildung 4.15: Links: Ein Cys-His-Cys-Motiv koordiniert das katalytisch aktive Zinkzentrum. Rechts: Stereospezifische Hydridübertragung vom Substrat Ethanol auf den Nikotinamidring des Cofaktors NAD^+ .^[102]

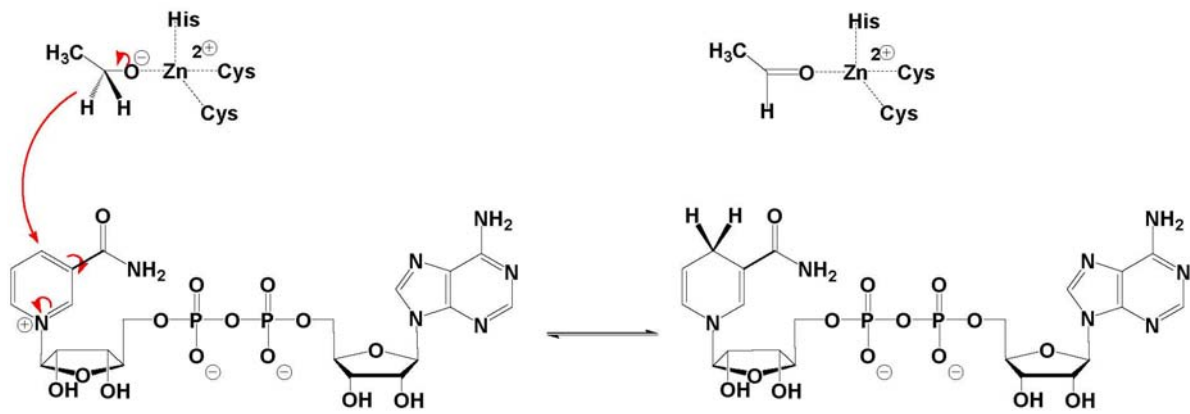


Abbildung 4.16: Reversible Oxidation des Substrats Ethanol durch die Alkohol-Dehydrogenase unter Bildung des Acetaldehyds.

Das katalytisch aktive Zinkzentrum ist für die Cofaktorbindung nicht essentiell. Selbst in Abwesenheit des katalytisch aktiven Zinkatoms findet die Bindung des Cofaktors NAD^+ an die Enzym-Bindungsstelle statt. Auch die Koordinationssphäre des Zinks bleibt von der Cofaktorbindung unbeeinflusst. Die Stabilisierung und Orientierung des Cofaktors erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäureresten des Proteinrückgrats. Sobald der Cofaktor an die „Active Site“ bindet, erfolgt eine Konformationsänderung. Durch diese oft als „Induced Fit“ bezeichnete Konformationsänderung wird das Protein von einer offenen in eine geschlossene Form überführt unter gleichzeitiger Öffnung der Substratbindungsstelle. Dabei wird die Substratbindende Domäne, der freie Kanal, so ausgerichtet, dass das Substrat Ethanol bei Bindung an das Zink-Ion optimal orientiert wird. Diese Orientierung erleichtert den für die enzymatische Aktivität essentiellen Reaktionsschritt – die stereospezifische Hydridübertragung.^[87, 105] Die Richtung der enzymatischen Umsetzung durch die Alkohol-Dehydrogenase, der Abbau von Alkohol zum Aldehyd und die Rückreaktion dieser, Aldehyd zu Alkohol, kann über den pH-Wert beeinflusst werden.^[106, 107] Während die Oxidation von Ethanol zum Acetaldehyd durch einen höheren pH-Wert (pH 8.6 – 9.0) begünstigt wird, läuft die Rückreaktion besonders gut bei einem pH-Wert um 7.0 ab. Daher werden ADH-Assays *in vitro* oft im alkalischen Milieu bei einem pH-Wert von 8.6 - 9.0 durchgeführt, um das Gleichgewicht dieser Redoxreaktion zugunsten der Oxidation des Ethanols zu verschieben. Aus demselben Grund wird dem Assay Semicarbazid zugefügt. Dieses dient zum Abfang des entstandenen Acetaldehyds, so dass dieser nicht wieder zum Ethanol zurück reduziert werden kann. Semicarbazid wird dabei zu Semicarbazon umgesetzt. Bei pH-Werten unterhalb von 6.0 und oberhalb von 8.5 wird das Enzym zunehmend instabiler. Alkohol-Dehydrogenasen

können neben kurzen linearen Alkoholen, wie Ethanol, auch andere längerkettige oder verzweigte Alkohole oxidieren. Dies ist allerdings mit einer deutlichen Zunahme der Umwandlungsgeschwindigkeit verbunden. Methanol wird z. B. sehr langsam zum hochgiftigen Formaldehyd oxidiert und damit im Körper auch nur sehr langsam abgebaut. Da der gebildete Formaldehyd die lichtempfindlichen Proteine in der Retina zerstört, können geringe Mengen Methanol zu Blindheit führen. Größere Mengen des an sich nur schwach toxischen Methanols sind aufgrund der daraus resultierenden hohen Konzentration an Formaldehyd tödlich. Da Methanol im Gegensatz zu Ethanol viel langsamer von ADH metabolisiert wird, kann eine Methanolvergiftung mit Ethanol behandelt werden. Das dem Patienten langsam intravenös verabreichte Ethanol verhält sich gegenüber Methanol als kompetitiver Inhibitor. Indem Ethanol mit Methanol um die Bindung an die „Active Site“ der Alkohol-Dehydrogenase konkurriert, wird die Bildung von Formaldehyd verlangsamt. Auf diese Weise kann ein Großteil des Methanols über den Urin ausgeschieden werden, bevor die Oxidation zu Formaldehyd erfolgte.^[13] Die erhöhten Aldehyd-Konzentrationen - insbesondere von Acetaldehyd - nach durchzechten Nächten verursachen am nächsten Morgen das klassische Kater-Syndrom. In der Alkoholtherapie nutzt man diese unangenehme physiologische Wirkung von Acetaldehyd bewusst aus, indem man dem Patienten das Medikament Antabus verabreicht.^[102] Bei diesem Medikament handelt es sich um die Verbindung Tetraethylthiuramdisulfid, deren Wirkung darin besteht, die Aldehyd-Dehydrogenase zu blockieren. Auf diese Weise wird eine rasche Weiteroxidation von Acetaldehyd verhindert, so dass schon geringe Alkoholmengen schwere Kater-Syndrome verursachen. Für die Alkohol-Dehydrogenase sind nur wenige Inhibitoren bekannt. Der wichtigste unter ihnen ist Fomepizol (Abbildung 4.17). Dieser wird zur Behandlung von akuten Vergiftungen mit Ethylenglykol in Form einer parenteralen Infusionslösung verabreicht. Fomepizol wirkt als kompetitiver Hemmstoff und weist im Vergleich zu Ethanol eine etwa 500 bis 1000mal höhere Affinität gegenüber ADH auf. Daher genügen schon minimale Konzentrationen an Fomepizol, um die enzymatische Aktivität der ADH vollständig zu hemmen.

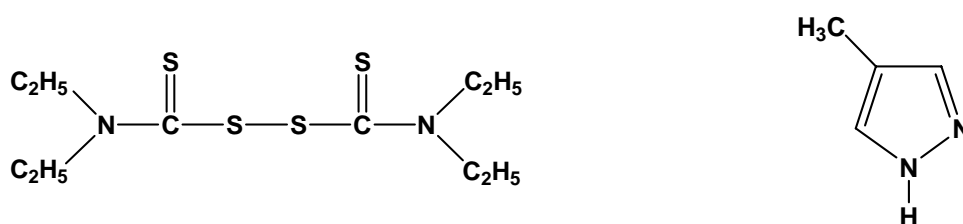


Abbildung 4.17: Strukturformeln zweier ADH-Inhibitoren. Links: Tetraethylthiuramdisulfid (Antabus); rechts: Fomepizol.

4.2.2 Enzymkinetische Untersuchungen der ADH^[108]

Dass sich die ADH als „Proto-Enzym“ eignet, um die künstlichen Rezeptoren zum ersten Mal unter physiologischen Bedingungen zu testen, ist auf zwei Faktoren zurückzuführen. Zum einen wird der Cofaktor NAD^+ nur relativ schwach in der „Active Site“ gebunden ($K_D = 610 \mu\text{M}$), so dass für beide externe Kompetitoren Clip **606** und **622**, die Möglichkeit besteht, mit NAD^+ einen zur „Rossmann-Spalte“ vergleichsweise stabileren Komplex zu bilden.^[106] Zum anderen ist der ADH-Assay schnell etabliert und einfach durchführbar, so dass in kürzester Zeit nachgewiesen werden kann, ob sich die durch ADH katalysierte enzymatische Oxidation von Ethanol in Gegenwart des Cofaktors NAD^+ durch den Einsatz der vier Rezeptormoleküle hemmen lässt oder nicht. Die in diesem Assay eingesetzte leicht basische ($\text{pI} \approx 8$) Alkohol-Dehydrogenase (YADH) stammt aus Baker's Yeast (*saccharomyces cerevisiae*).^[98]

4.2.2.1 Etablierung des ADH-Assays

Ob diese vier Rezeptormoleküle als potentielle ADH-Inhibitoren wirklich geeignet sind, sollte zunächst durch die Bestimmung der IC_{50} -Werte geklärt werden. Dazu war es nötig, den ADH-Assay so effizient wie möglich zu gestalten. Dabei sollte die NAD^+ -Konzentration so gering gewählt werden, dass später möglichst wenig Inhibitor eingesetzt werden muss. Doch schon die kleinste Verringerung der vorgeschriebenen NAD^+ -Konzentration, z. B. auf die Hälfte, erwies sich als problematisch. Die erhaltenen Kinetik-Kurven wurden mit abnehmender NAD^+ -Konzentration immer flacher und ließen letztendlich keine eindeutige Auswertung mehr zu. Erstrebenswert sind Kinetik-Kurven, die über einen möglichst langen Zeitraum linear verlaufen, da nur diese Werte zur Auswertung herangezogen werden dürfen. Dieser anfänglich lineare Verlauf war allerdings meistens nur von kurzer Dauer, bevor die Kinetik-Kurven in die Sättigung übergingen. Eine Erklärung dafür liefern die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten der oxidierten Form NAD^+ ($K_D = 610 \mu\text{M}$) und des bei der Redoxreaktion gebildeten Reduktionsproduktes NADH ($K_D = 18 \mu\text{M}$).^[106] Aus diesen K_D -Werten geht hervor, dass die reduzierte Form ca. 34mal stärker in der „Rossmann-Spalte“ gebunden wird als die oxidierte Form NAD^+ . Die Folge ist eine durch NADH verursachte Produktinhibition. Offenbar blockiert NADH aufgrund seiner starken Bindung an die „Rossmann-Spalte“ dem Cofaktor NAD^+ den Zugang zur „Active Site“, was sich in einer

drastischen Abnahme der enzymatischen Umsetzungsreaktion äußert. Diese Produktinhibition lässt sich auch durch einen großen Überschuss an NAD^+ nicht kompensieren. Um diesen inhibitorischen Effekt des NADH möglichst gering zu halten, wird bei dem vorliegenden Assay der Cofaktor NAD^+ (1.83 mM) in einem 110.000-fachen Überschuss gegenüber dem Enzym ADH (16.68 nM) eingesetzt. Nur die Anwesenheit eines solch großen Überschusses an Cofaktor gewährleistet eine zuverlässige Substratumwandlung. Weitere Komponenten, die diesem Assay zugesetzt werden müssen, um eine eindeutige Auswertung des ADH-Assays zu gewährleisten, sind Bovines Serum Albumin (BSA), Glutathion (GSH) und Semicarbazid. Die jeweiligen Konzentrationen sind der Tabelle 4.1 zu entnehmen. Bovines Serum Albumin wird dem Assay zum Schutz der ADH vor eventuell vorhandenen Proteasen hinzugegeben. Da BSA von Proteasen leichter zerschnitten wird als ADH, nimmt es die Funktion eines Opferproteins ein. Die Aufgabe des eingesetzten Semicarbazids besteht darin, das bei der enzymatischen Oxidation von Ethanol entstehende Acetaldehyd unter Bildung von Semicarbazon abzufangen. Durch Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der Produkte wird die Rückreaktion, die Reduktion des Acetaldehyds zu Ethanol, verhindert. Der Zusatz von Glutathion dient dem Schutz des ADH-Zinkfinger-Motivs vor eventueller Oxidation.

	<i>Einwaage</i>	<i>pH</i>	<i>c(Stammlösung)</i>	<i>c(Assay)</i>
Puffer	5.98 g Natriumpyrophosphat und 0.5 g Glycin in 300 mL bi-dest. Wasser lösen	9.00	75 mM	53.4 mM
			22.2 mM	15.8 mM
Semicarbazid	3.19 g in 13 mL 2 M NaOH	6.33	2.2 M	66 mM
GSH	92.199 mg in 1 mL bi-dest. Wasser		300 mM	9 mM
BSA	1.5 mg in 1.5 mL bi-dest. Wasser		1 mg/mL	
ADH	10 μL ADH-Suspension (294 μg ADH) 1:100 in BSA <i>1:10 Verdünnung in Puffer</i> <i>insgesamt 1:1000 Verdünnung</i>		208 nM	16.68 nM
NAD^+	45.94 mg in 2.5 mL bi-dest. Wasser		27.7 mM	1.83 mM

Tabelle 4.1: Zusammensetzung und Konzentrationen des klassischen ADH-Assays.

Alle Untersuchungen des ADH-Assays wurden auf einer UV/Vis-durchlässigen 96-Loch-Mikroplatte durchgeführt. Dabei wird die Enzymkinetik während der gesamten Zeit am Microplate Absorbance Reader MRX verfolgt. Die Messung des Assays erfolgt also kontinuierlich. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein Filter-Photometer, der die optische Dichte (O.D.) jeder Vertiefung der 96-Loch-Mikroplatten detektiert. Die optische Dichte ist wie folgt definiert:

$$\text{O.D.} = -k \cdot \log(I_0/I) = k \cdot \log a \cdot b \cdot c \quad (20)$$

- k : Absorptionskoeffizient
 I_0 : Lichtintensität der leeren Mulde
 I : Lichtintensität der gemessenen Probe
 a : substratspezifische Konstante
 b : Länge
 c : Konzentration der zu untersuchenden Verbindung

Das Prinzip dieser Messmethode besteht darin, die im Verlauf des ADH-Assays verbrauchte Menge an NAD^+ indirekt über den Anstieg des gebildeten Reduktionsproduktes NADH UV/Vis-spektroskopisch in Form von mOD-Werten (mittlere optische Dichte) zu detektieren und zu quantifizieren. Dies ist möglich, da wie in Abbildung 4.18 gezeigt wird, die reduzierte Form NADH im Gegensatz zur oxidierten Form NAD^+ ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 340 nm aufweist. Mit fortschreitender Reaktion wird die Extinktion der NADH-Bande aufgrund kontinuierlich stattfindender Reduktion von NAD^+ zu NADH immer größer und damit auch deren mOD-Werte. Die Auftragung aller gemessenen mOD-Werte gegen die Zeit t liefert schließlich die entsprechenden Kinetik-Kurven. Zur Auswertung dürfen allerdings, wie zuvor erwähnt, nur die mOD-Werte berücksichtigt werden, die einem linearen Verlauf entsprechen. Die Differenz, die sich aus dem letzten dieser mOD-Werte und dem Startpunkt ergibt, entspricht ΔmOD . Setzt man diesen ΔmOD -Wert mit der Zeit t in Beziehung, resultiert die Enzymgeschwindigkeit v_0 , aus der sich Rückschlüsse auf die jeweiligen Enzymkinetiken gewinnen lassen.

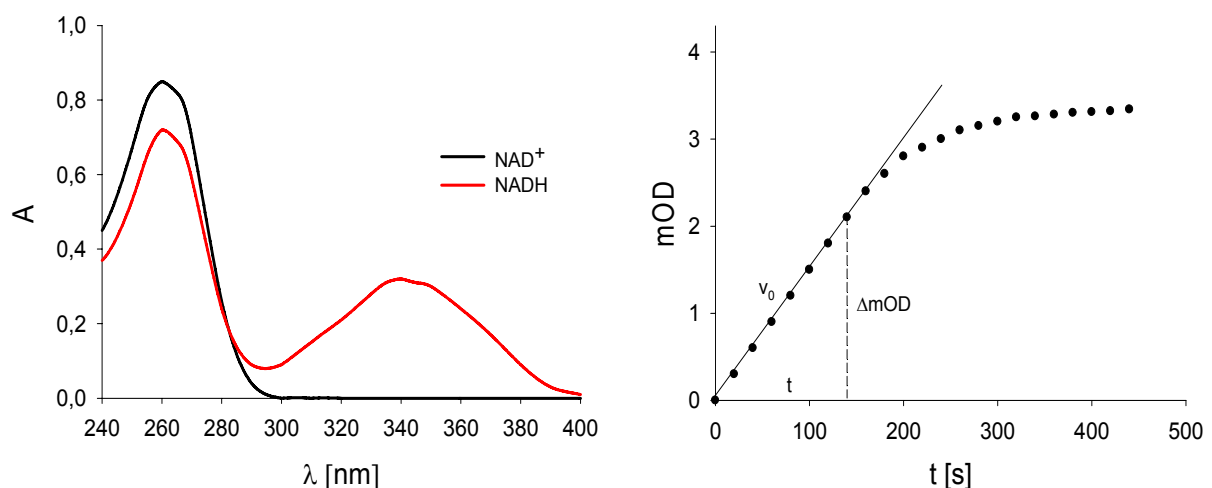


Abbildung 4.18: Links: Absorptionsspektren der oxidierten (schwarze Kurve) und reduzierten Form von NAD^+ (rote Kurve). Rechts: Bestimmung der Enzymgeschwindigkeit v_0 durch Auftragung der mOD-Werte gegen die Zeit t .

4.2.2.2 Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte, deren Durchführung in Kapitel 6.3.1.1 beschrieben ist, wurde insgesamt dreimal wiederholt. In der Tabelle 4.2 sind die IC₅₀-Werte der vier Rezeptoren für alle drei Messungen und die sich daraus ergebenden Mittelwerte zusammengefasst.

Rezeptoren	IC ₅₀ -Werte			
	V1	V2	V3	MW
Clip 606	2.53 mM	2.36 mM	2.02 mM	2.30 mM
Clip 622	1.53 mM	1.52 mM	1.38 mM	1.47 mM
Tweezer 734	406 µM	317 µM	365 µM	363 µM
Tweezer 750	178 µM	173 µM	182 µM	178 µM

Tabelle 4.2: Übersicht der IC₅₀-Werte der einzelnen Versuche V1-V3 und ihrer Mittelwerte MW.

Wie man der Tabelle 4.2 entnehmen kann, liegen die IC₅₀-Werte der beiden Clips im einstelligen mikromolaren Bereich. Diese hohen IC₅₀-Werte sind auf den im Assay verwendeten großen Überschuss an Cofaktor zurückzuführen und müssen daher mit der eingesetzten NAD⁺-Konzentration (1.8 mM) in Beziehung gesetzt werden. Für Clip **606** ergibt sich ein gemittelter IC₅₀-Wert von 2.30 mM, was ca. 1.3 eq bzgl. des Cofaktors NAD⁺ entspricht. Für Clip **622** folgt einer von 1.47 mM, entsprechend ca. 0.8 eq bzgl. des Cofaktors NAD⁺. Der für Clip **606** ermittelte IC₅₀-Wert bestätigt damit den zuvor für die beiden Clips postulierten kompetitiven Hemm-Mechanismus, nach dem die Enzyminhibition durch Abfang des Cofaktors NAD⁺ induziert wird. Im Fall des Clips **606** ist allein dieser Effekt für die Hemmung der Enzymaktivität verantwortlich. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass ein geringer Überschuss an Clip **606** bzgl. der im Assay eingesetzten NAD⁺-Menge ausreicht, um eine 50%ige ADH-Inhibition zu induzieren. Ein Vergleich der beiden IC₅₀-Werte zeigt, dass Clip **622** einen deutlich effektiveren Inhibitor als Clip **606** darstellt. Es reichen hier bereits substöchiometrische Mengen an Inhibitor bzgl. NAD⁺ aus, um ADH effektiv hemmen zu können. Damit lässt sich die Enzymhemmung nicht mehr allein mit der Komplexbildung des Cofaktors erklären, da dieser Fall mindestens stöchiometrische Mengen an Inhibitor erfordert. Es muss also noch ein zusätzlicher Effekt eine Rolle spielen, der die Inhibition

durch den Clip **622** so effektiv gestaltet. Eine plausible Erklärung hierfür könnten die beiden zusätzlichen negativen Ladungen der Phosphat-Substituenten liefern. Im Gegensatz zu den beiden Phosphonat-Methylgruppen des Clips **606** befähigen die beiden negativ geladenen Phosphat-Sauerstoff-Atome den Clip **622** elektrostatische Wechselwirkungen mit auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenresten einzugehen. Ein Blick in die Kristallstruktur der ADH mit dem PDB-Code 1PS0 offenbart, dass sich in unmittelbarer Nähe beider Bindungsstellen mehrere basische Aminosäurenreste befinden, mit denen Clip **622** durchaus Wechselwirkungen eingehen könnte. Die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes könnte die Flexibilität der für die enzymatische Reaktion essentiellen Konformationsänderung negativ beeinträchtigen und folglich Inhibition induzieren. Dies würde für die höhere inhibitorische Effizienz des Clips **622** gegenüber dem Clip **606** erklären. Für die beiden Tweezers **734** und **750** muss dagegen ein völlig anderer Hemm-Mechanismus vorliegen. Obwohl diese den Cofaktor NAD^+ deutlich schwächer in ihrer Kavität binden als die beiden Clips **606** und **622** erweisen sich beide Tweezers als wesentlich effektivere Inhibitoren. Von beiden Tweezern werden nur substöchiometrische Mengen benötigt, um die enzymatische Aktivität der ADH zu inhibieren. Für Tweezer **734** ergibt sich ein gemittelter IC_{50} -Wert von $364 \mu\text{M}$ (0.2 eq bzgl. NAD^+) und für Tweezer **750** einer von $178 \mu\text{M}$ (0.1 eq bzgl. NAD^+). Eine plausible Erklärung für ihre hohe Effizienz hinsichtlich der Enzymhemmung könnte eine durch die Tweezers **734** und **750** selektive Komplexierung kritischer basischer Aminosäurenreste im Bereich der Enzym-Bindungsstelle liefern.

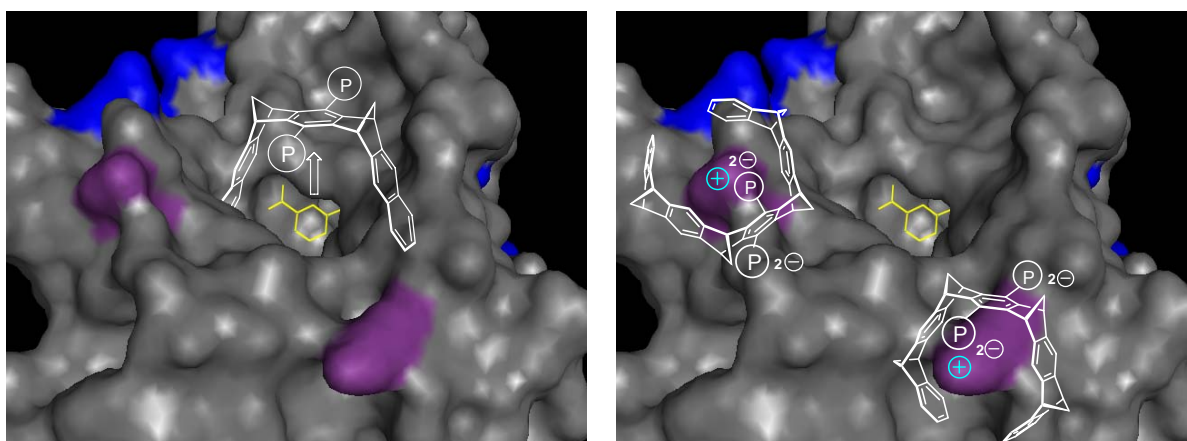


Abbildung 4.19: Vereinfachte Darstellung der beiden postulierten Hemm-Mechanismen für die beiden Clips **606** und **622** (links) sowie für die beiden Tweezers **734** und **750** (rechts). Während die beiden Clips den Cofaktor NAD^+ (gelb) aus der „Rossmann-Spalte“ herausziehen, komplexieren die beiden Tweezer die im Bereich der „Active Site“ befindlichen basischen Aminosäurenreste (Lysin = violett, Arginin = blau). Die abgebildete Kristallstruktur mit dem PDB-Code 1PS0 entstammt der Protein Datenbank.^[109]

Wie aus der Kristallstruktur der ADH hervorgeht, befinden sich in unmittelbarer Nähe der „Rossmann-Spalte“ mehrere basische Aminosäurenreste. Eine selektive Komplexierung dieser könnte dazu beitragen, dass dem Cofaktor bzw. dem Substrat der Zugang zur „Active Site“ verwehrt wird. Die Folge wäre Enzyminhibition. In der Abbildung 4.19 sind die beiden postulierten unterschiedlichen Hemm-Mechanismen für die beiden Clips und die beiden Tweezer vereinfacht dargestellt.

Wie die in Abbildung 4.20 dargestellten IC_{50} -Kurven zeigen, eignen sich alle untersuchten Rezeptormoleküle als ADH-Inhibitoren. Tweezer **750** verfügt dabei über das größte inhibitorische Potential. Er ist doppelt so effektiv wie der Phosphonat-substituierte Tweezer **734** und ca. zehnmal so effektiv wie die beiden Clips **606** und **622**.

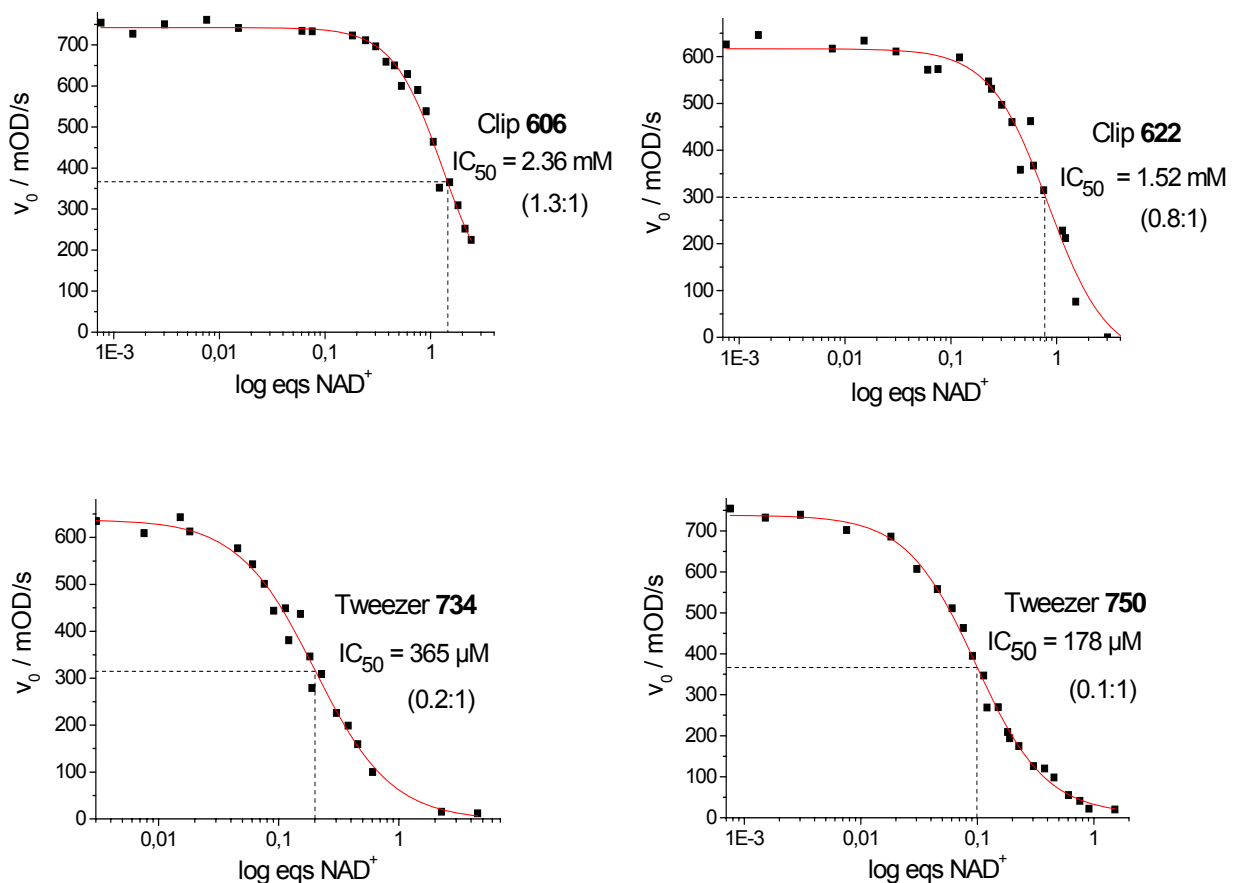


Abbildung 4.20: Übersicht der IC_{50} -Kurven aller vier künstlichen Rezeptormoleküle.

4.2.2.3 Untersuchung des Ursprungs der inhibitorischen Wirksamkeit beider Inhibitor-Klassen

Im folgenden Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass beide Clips und beide Tweezers ihre inhibitorischen Fähigkeiten allein der Existenz ihrer Seitenwände und der daraus resultierenden Kavität verdanken und nicht auf elektrostatische Wechselwirkungen der Phosphonat- bzw. Phosphat-Substituenten mit den auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenresten zurückzuführen sind. Dazu wurde der ADH-Assay unter den gleichen Bedingungen wie bei der Bestimmung der IC_{50} -Werte durchgeführt. Anstelle der beiden Clips und Tweezer wurde dieses Mal allerdings die Modellverbindung Spacer **422** auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht.

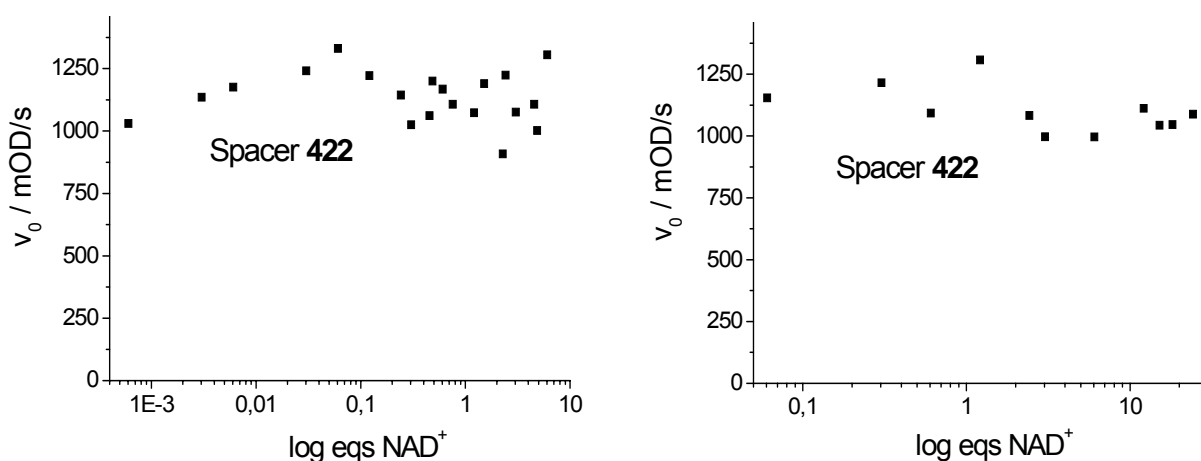


Abbildung 4.21: Für die Modellverbindung Spacer **422** lassen sich keine IC_{50} -Werte bestimmen. Die ADH-Aktivität bleibt sogar in Anwesenheit von 10 eq (links) bzw. 30 eq (rechts) des Spacers **422** bzgl. NAD^+ unbeeinflusst.

Im Gegensatz zu den vier Rezeptormolekülen verfügt diese Modellverbindung über keine Seitenwände. Für den Fall, dass die Seitenwände für eine effektive Inhibition wirklich unerlässlich sind, sollte in Anwesenheit des Spacers **422** keine ADH-Inhibition auftreten. Wie man der Abbildung 4.21 entnehmen kann, trifft dies auch zu. Selbst bei einem 30-fachen Mol-Überschuss an Spacer **422** bzgl. NAD^+ findet keine enzymatische Hemmung statt.

Dieses Experiment beweist damit eindeutig, dass die inhibitorische Effizienz aller vier Rezeptormoleküle auf authentische supramolekulare Effekte und nicht auf unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen mit auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenresten zurückzuführen ist.

Einen weiteren Beweis dafür lieferte ein in Anwesenheit von Kochsalz durchgeführter ADH-Assay. Daraus geht hervor, dass die inhibitorische Effizienz aller Rezeptormoleküle auch bei einer NaCl-Konzentration von 250 mM erhalten bleibt. Exemplarisch für alle untersuchten Inhibitoren sind in den folgenden beiden Abbildungen 4.22 und 4.23 nur die Spektren des Tweezers **750** und des Clips **622** in Anwesenheit unterschiedlicher Salz-Konzentrationen dargestellt. Die Inhibitorkonzentration beträgt im Fall des Tweezers **750** stets 1 mM und im Fall des Clips **622** stets 4 mM.

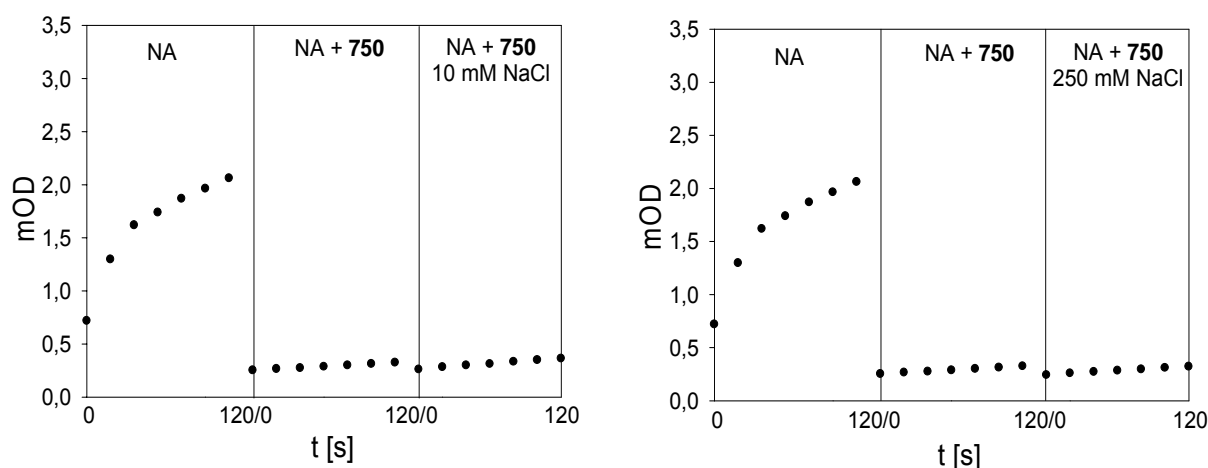


Abbildung 4.22: Durchführung des normalen ADH-Assays (NA) in Gegenwart des Inhibitors Tweezer **750** bei unterschiedlichen Kochsalz-Konzentrationen.

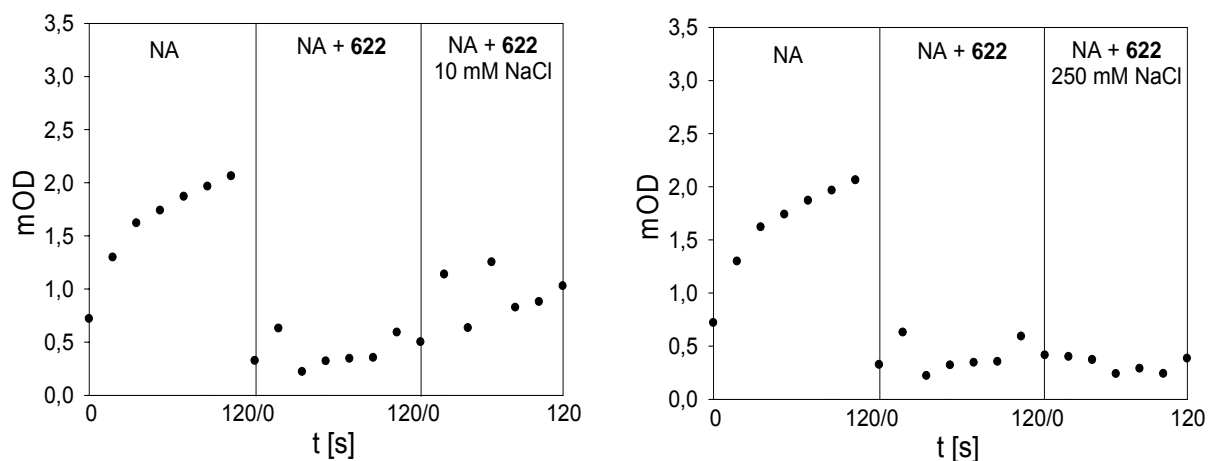


Abbildung 4.23: Durchführung des normalen ADH-Assays (NA) in Gegenwart des Inhibitors Clip **622** bei unterschiedlichen Salz-Konzentrationen.

4.2.2.4 Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots

Als nächstes folgte die Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots. Mit ihrer Hilfe sollte überprüft werden, ob die zuvor postulierten Hemm-Mechanismen für die beiden Clips **606** und **622** sowie für die beiden Tweezers **734** und **750** auch wirklich zutreffen. Zuvor musste allerdings geklärt werden, nach welchem Mechanismus die im Assay verwendete ADH aus Baker's Yeast (*saccharomyces cerevisiae*) arbeitet. Da die Enzymaktivität durch zwei Substrate beeinflusst wird, Ethanol und NAD^+ , liegt im Fall der ADH ein Bireaktanten-Modell vor. Gleiches gilt auch für die später untersuchte Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD). Anhand von Experimenten mit so genannten reversiblen Analog-Inhibitoren für die beiden Substrate NAD^+ und Ethanol sollten sich unter Berücksichtigung dieses Bireaktanten-Modells Informationen über den Enzym-Mechanismus der ADH gewinnen lassen. Laut Literatur ist Thionikotinamidadenindinucleotid ($S\text{-NAD}^+$) ein geeigneter Analog-Inhibitor für den Cofaktor NAD^+ und Chlor- bzw. Fluorethanol ein geeigneter Analog-Inhibitor für Ethanol.^[106] Die Untersuchungen wurden allerdings auf den Analog-Inhibitor $S\text{-NAD}^+$ beschränkt. Die dabei erhaltenen Lineweaver-Burk-Plots lieferten das für die ADH in der Literatur beschriebene typische charakteristische Kinetik-Schema C-NC-UC-C (C, kompetitiv; NC, nichtkompetitiv; UC, unkompetitiv).^[84] Dieses klassifiziert die ADH als „Steady-State, Sequential Ordered Model“. Folglich ist die Reihenfolge der Substratbindung an die „Active Site“ des Enzyms entscheidend. Nur unter der Voraussetzung, dass das Substrat A, hier der Cofaktor NAD^+ , zuerst an die „Active Site“ der ADH bindet, erfolgt die für einen erfolgreichen Ablauf der enzymatischen Reaktion entscheidende Konformationsänderung. Diese durch die Cofaktor-Bindung induzierte Konformationsänderung bewirkt, dass die „Rossmann-Spalte“ geschlossen und die Substratbindungsstelle geöffnet wird, so dass eine optimale Hydrid-Übertragung vom Substrat auf den Cofaktor erfolgen kann.^[87] In der Abbildung 4.24 ist das „Steady-State, Sequential Ordered Model“ dargestellt.

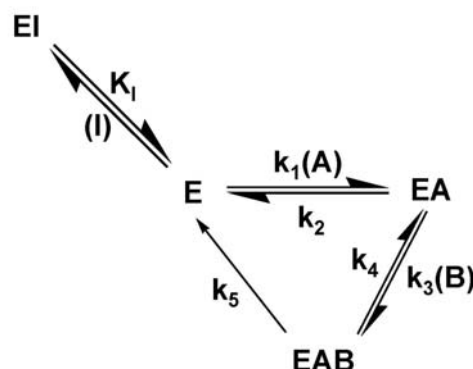


Abbildung 4.24: „Steady-State, Sequential Ordered Model“, A: Substrat 1; B: Substrat 2.

Das dazugehörige Kinetik-Schema C-NC-UC-C ist der Tabelle 4.3 zu entnehmen.

Analog-Inhibitoren	Chlorethanol		S-NAD ⁺	
Variable Substrate	Ethanol	NAD ⁺	Ethanol	NAD ⁺
Kinetik Schema	C	NC	UC	C

Tabelle 4.3: Das charakteristische Kinetik-Schema C-NC-UC-C (C, kompetitiv; NC, nichtkompetitiv; UC, unkompetitiv) klassifiziert die ADH als „Steady-State, Sequential Ordered Model“.

Abbildung 4.25 zeigt die in diesem Zusammenhang ermittelten Lineweaver-Burk-Plots für den Analog-Inhibitor S-NAD⁺ bei variablen Cofaktor- und Substratkonzentrationen.

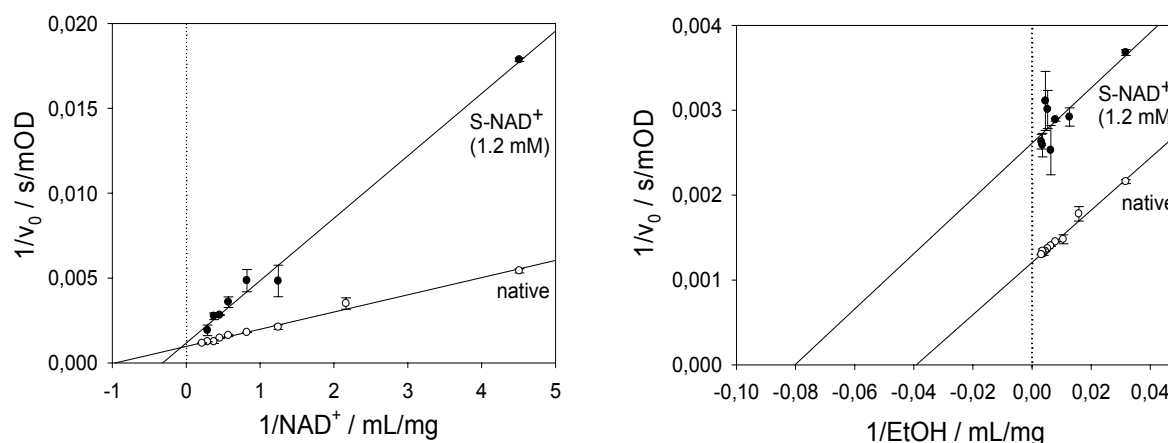


Abbildung 4.25: Lineweaver-Burk-Plots des Analog-Inhibitors S-NAD⁺ bei variabler Cofaktor- und Substratkonzentration. Links: Der Analog-Inhibitor zeigt bei variablen NAD⁺-Konzentrationen eine kompetitive Hemmung (links) und bei variablen Ethanolkonzentrationen eine unkompetitive Hemmung (rechts).

Nachdem eindeutig bewiesen werden konnte, dass die im Assay verwendete ADH einem „Steady-State, Sequential Ordered Model“ folgt, wurden die Lineweaver-Burk-Plots der beiden Clips **606** und **622** sowie der beiden Tweezers **734** und **750** bestimmt. Da im Fall der ADH ein so genanntes Bireaktanten-Modell mit zwei getrennten Bindungstaschen für Cofaktor und Substrat vorliegt, müssen die Lineweaver-Burk-Plots sowohl in Abhängigkeit der Cofaktor- als auch der Substratkonzentration ermittelt werden.

Die Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots erfolgte analog der Bestimmung der IC_{50} -Werte. Die reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit $1/v_0$ in Abhängigkeit der Cofaktorkonzentration $1/[NAD^+]$ bzw. der Substratkonzentration $1/[EtOH]$ lieferte die entsprechenden Lineweaver-Burk-Plots. Mit deren Hilfe ließen sich anschließend Rückschlüsse auf die entsprechenden Hemm-Mechanismen der jeweiligen Inhibitoren gewinnen. Die in Abbildung 4.26 dargestellten Lineweaver-Burk-Plots zeigen für beide Clips bei variabler Substratkonzentration einen nichtkompetitiven und bei variabler Cofaktorkonzentration einen kompetitiven Hemm-Mechanismus. Demnach konkurrieren beide Clips zwar um die Cofaktor-Bindung, aber nicht um die Substrat-Erkennung. Die Lineweaver-Burk-Plots bestätigen damit nicht nur den zuvor postulierten Cofaktor-Abfang-Hemm-Mechanismus für die beiden Clips, sondern unterstützen ferner die zuvor für Clip **622** vermutete zusätzliche inhibitorische Fähigkeit der direkten Bindung an das Enzym.

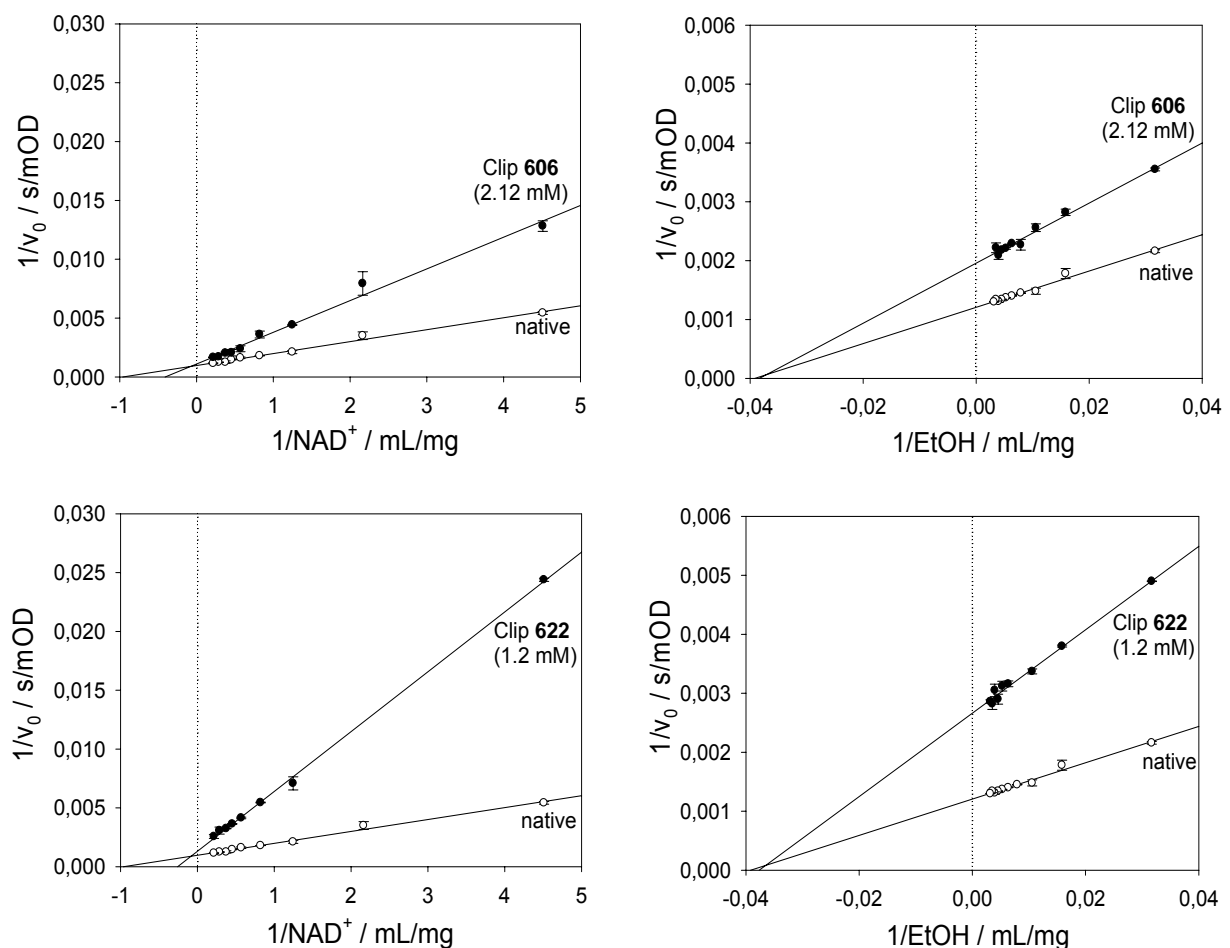


Abbildung 4.26: Lineweaver-Burk-Plots der beiden Clips **606** und **622** bei variabler Cofaktorkonzentration (links) und bei variabler Substratkonzentration (rechts).

Auch für die beiden Tweezers **734** und **750** konnte mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Plots der zuvor postulierte Hemm-Mechanismus bestätigt werden. Wie man den Lineweaver-Burk Auftragungen in der Abbildung 4.27 entnehmen kann, liegt im Fall variabler Substratkonzentrationen ein gemischter und im Fall variabler Cofaktorkonzentrationen ein nichtkompetitiver Hemm-Mechanismus vor. Demnach induzieren beide Tweezers im Gegensatz zu den beiden Clips ADH-Inhibition nicht durch Cofaktor-Abfang, sondern durch Komplexierung der auf der Proteinoberfläche befindlichen kritischen basischen Aminosäurenreste. Durch diese Komplexierung wird sowohl dem Substrat als auch dem Cofaktor der Zugang zur „Active Site“ blockiert. Dies befähigt die beiden Tweezer zu deutlich effektiveren Inhibitoren gegenüber den Clips.

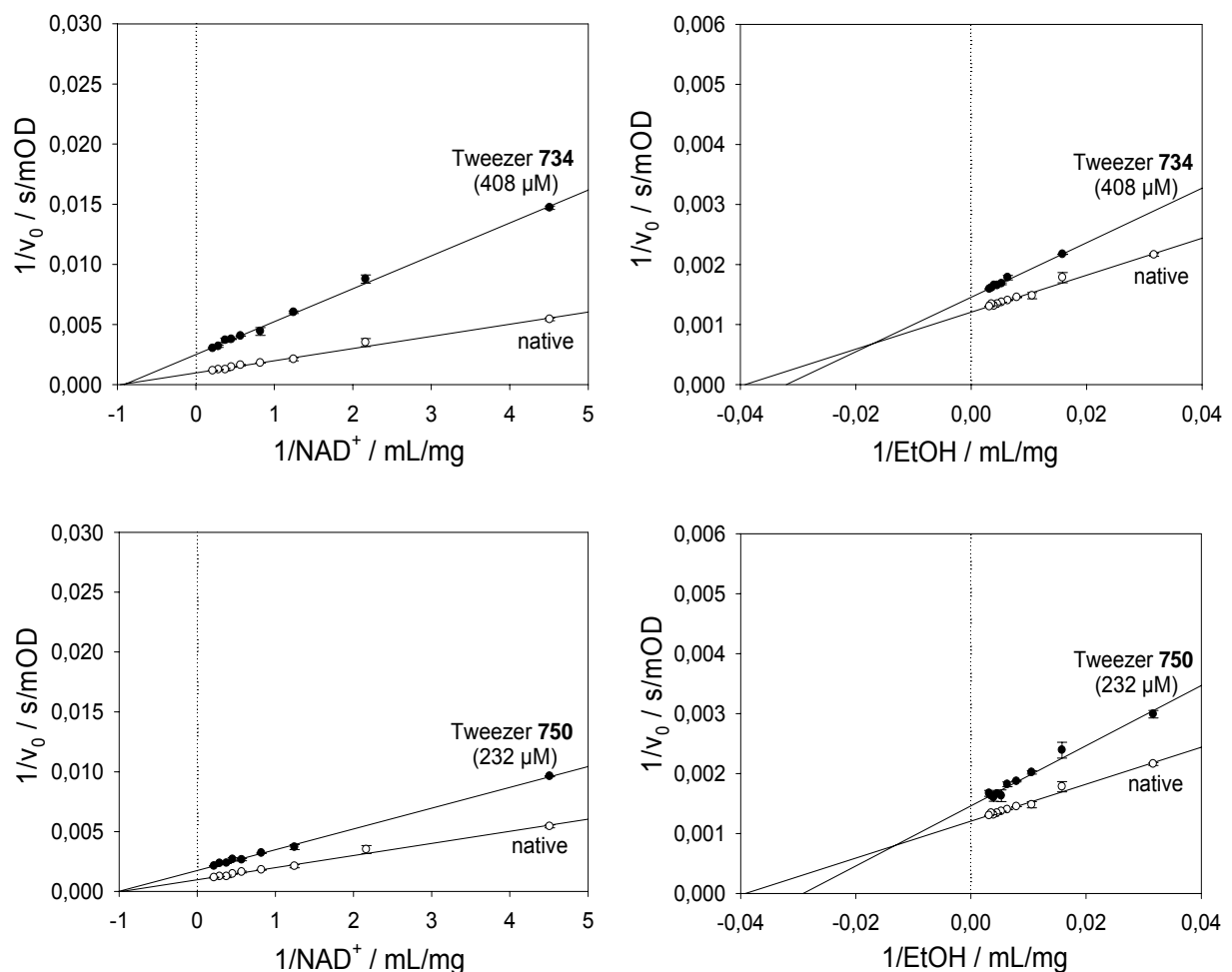


Abbildung 4.27: Lineweaver-Burk-Plots der beiden Tweezers **734** und **750** bei variabler Cofaktorkonzentration (links) und bei variabler Substratkonzentration (rechts).

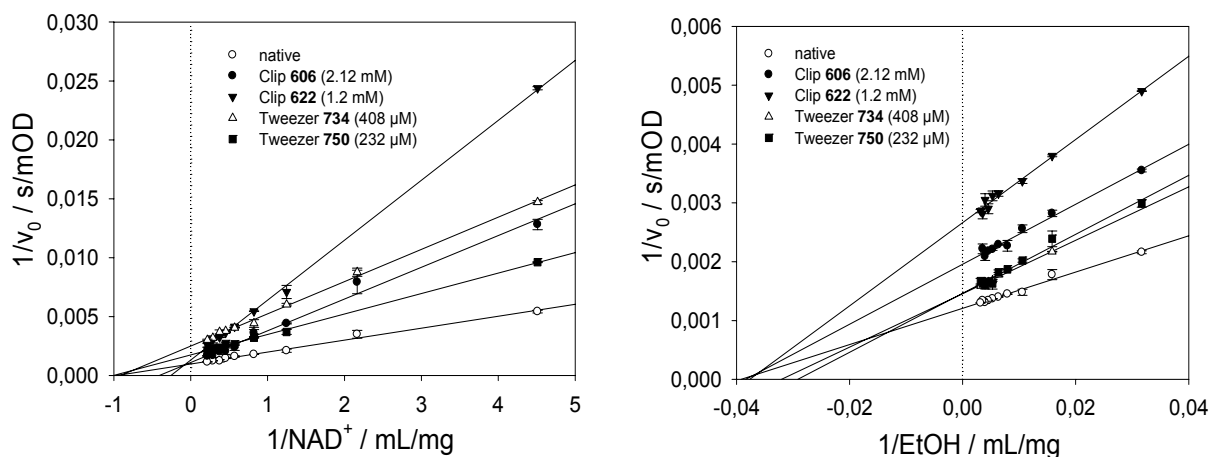


Abbildung 4.28: Übersicht der Lineweaver-Burk-Plots aller vier Inhibitoren bei variabler Cofaktorkonzentration (links) und bei variabler Substratkonzentration (rechts).

4.2.2.5 Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente

Nachdem nun die IC_{50} -Werte (Tabelle 4.3) und Lineweaver-Burk-Plots aller vier Inhibitoren (Abbildung 4.28) eindeutig bestimmt wurden, sollte als nächstes überprüft werden, ob es möglich ist, die Enzymaktivität nach vorausgegangener Inhibition durch Zugabe geeigneter Konkurrenz-Moleküle wieder anzuschalten.^[110] Gemäß der erhaltenen Lineweaver-Burk-Plots, die für die beiden Clips einen kompetitiven und für die beiden Tweezer einen nichtkompetitiven Hemm-Mechanismus bestätigen, sollte dies für alle vier Inhibitoren möglich sein. Eine grundlegende Eigenschaft, über die alle geeigneten Konkurrenz-Moleküle verfügen müssen, ist die Bildung stabilerer Inhibitor-Konkurrenz-Molekül-Komplexe, verglichen mit den Komplexen zwischen Clip und NAD^+ bzw. Tweezer und auf der Proteinoberfläche befindlicher basischer Aminosäurenresten. Im Fall der beiden Clips **606** und **622** sollte eine Reaktivierung der Enzymaktivität sowohl durch Zugabe von zusätzlichem Cofaktor NAD^+ als auch durch Zugabe der beiden Konkurrenz-Moleküle *N*-Methylnikotinamidiodid (NMNA) und 2'-Deoxycytidin (DC) möglich sein. Wie aus den Dissertationen von M. Fokkens und F. Bastkowski hervorgeht, komplexiert Clip **606** diese beiden Konkurrenz-Moleküle stärker als NAD^+ .^[75, 79] Mittels ^1H -NMR-Titration konnte für *N*-Methylnikotinamid eine Dissoziationskonstante K_D von 30 μM und für 2'-Deoxycytidin eine Dissoziationskonstante K_D von 135 μM nachgewiesen werden.^[75, 79] Diese Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente sollten auch mit dem Tweezer **750** durchgeführt werden. Das geschützte Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe wurde hierfür als geeignetes Konkurrenz-Molekül

gewählt. Mit einer Dissoziationskonstante K_D von 20 μM sollte die Möglichkeit gegeben sein, dass der daraus resultierende Komplex stärker ist als der zwischen Tweezer und den auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenresten. In diesem Fall würde sich der Tweezer von der Proteinoberfläche unter Rückgewinnung der ursprünglichen Enzymaktivität lösen. Ein weiteres Konkurrenz-Molekül, das in diesem Zusammenhang untersucht werden sollte, war das Tetra-Lysin H-KKKK-OH. Aufgrund seiner vier aufeinander folgenden Lysin-Einheiten sollte es, verglichen mit den auf der Proteinoberfläche befindlichen Aminosäurenresten, für den Tweezer **750** einen bevorzugten Gast darstellen. Diese Annahme wurde durch eigene fluoreszenztitrimetrische Untersuchungen unterstützt, die für H-KKKK-OH sogar eine Dissoziationskonstante K_D von 10 μM ergaben. Für den Fall einer Reaktivierung der ursprünglichen Enzymaktivität durch entsprechende Konkurrenz-Moleküle sollte anschließend erneut Inhibitor zugegeben werden, um die Enzymaktivität wieder abzuschalten. Auf diese Weise wäre durch das Wechselspiel von Inhibitor und Konkurrenz-Molekül ein molekularer Schalter gegeben, mit dem man die enzymatische Reaktion beliebig kontrollieren könnte. Die Durchführung dieser Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente sah vor, dass während der enzymatischen Reaktion die Zugabe von Inhibitor und entsprechendem Konkurrenz-Molekül in abwechselnder Folge stattfindet.

4.2.2.5.1 Durchführung der Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente

Die Durchführung der Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente ist dem Kapitel 6.3.1.3 zu entnehmen. Zur Auswertung wurden die gemessenen mOD-Werte in Abhängigkeit von der Zeit t aufgetragen. Die daraus resultierenden Geschwindigkeiten v wurden mit der Anfangsgeschwindigkeit v_0 (Kinetikkurve des normalen ADH-Assays) in Beziehung gesetzt, um so Rückschlüsse gewinnen zu können, inwieweit sich die Enzymaktivität durch die Anwesenheit der Inhibitoren und der dazugehörigen Analog-Moleküle beeinflussen lässt.

4.2.2.5.2 Einfluss der Komponenten Clip 606 und 622 sowie Cofaktor NAD^+

Als erstes sollte überprüft werden, ob sich eine durch die beiden Rezeptormoleküle **606** und **622** teilweise hervorgerufene Inhibition durch Zugabe von zusätzlichem NAD^+ wieder aufheben lässt. Dazu wurde der normale ADH-Assay durchgeführt, dessen enzymatische Reaktion nach ca. zwei Minuten durch Zugabe von Clip **606** (2.74 mM) bzw. Clip **622**

(1.46 mM) bis zu 70% gestoppt wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von zusätzlichem NAD^+ , wodurch die enzymatische Substrat-Oxidation zwar wieder deutlich beschleunigt werden konnte, aber nie den Ursprungswert erreichte. Dies könnte ein Zeichen für eine partielle Denaturierung sein. Die besten Ergebnisse wurden mit einer zusätzlichen NAD^+ -Konzentration von 3.66 mM (2 eq bzgl. NAD^+) erzielt. Bei dieser NAD^+ -Konzentration konnte für Clip **606** eine 75%ige und für Clip **622** eine bis zu 95%ige Rückgewinnung der ursprünglichen Enzymaktivität erzielt werden. Höhere NAD^+ -Konzentrationen bis zu 9.14 mM (5 eq bzgl. NAD^+) lieferten dagegen überraschenderweise schlechtere Ergebnisse. Für Clip **606** ließen sich bei dieser Konzentration nur noch 50% und im Fall des Clips **622** nur noch 60% der ursprünglichen ADH-Aktivität zurückgewinnen. Wie sich zeigte, konnte eine Steigerung der Enzymaktivität durch Zugabe von zusätzlichem Cofaktor nur unter der Voraussetzung erzielt werden, dass die zuvor stattgefundenene Inhibition durch die beiden Clips nicht vollständig erfolgte. Diese Tatsache deutet auf einen irreversiblen Vorgang hin.

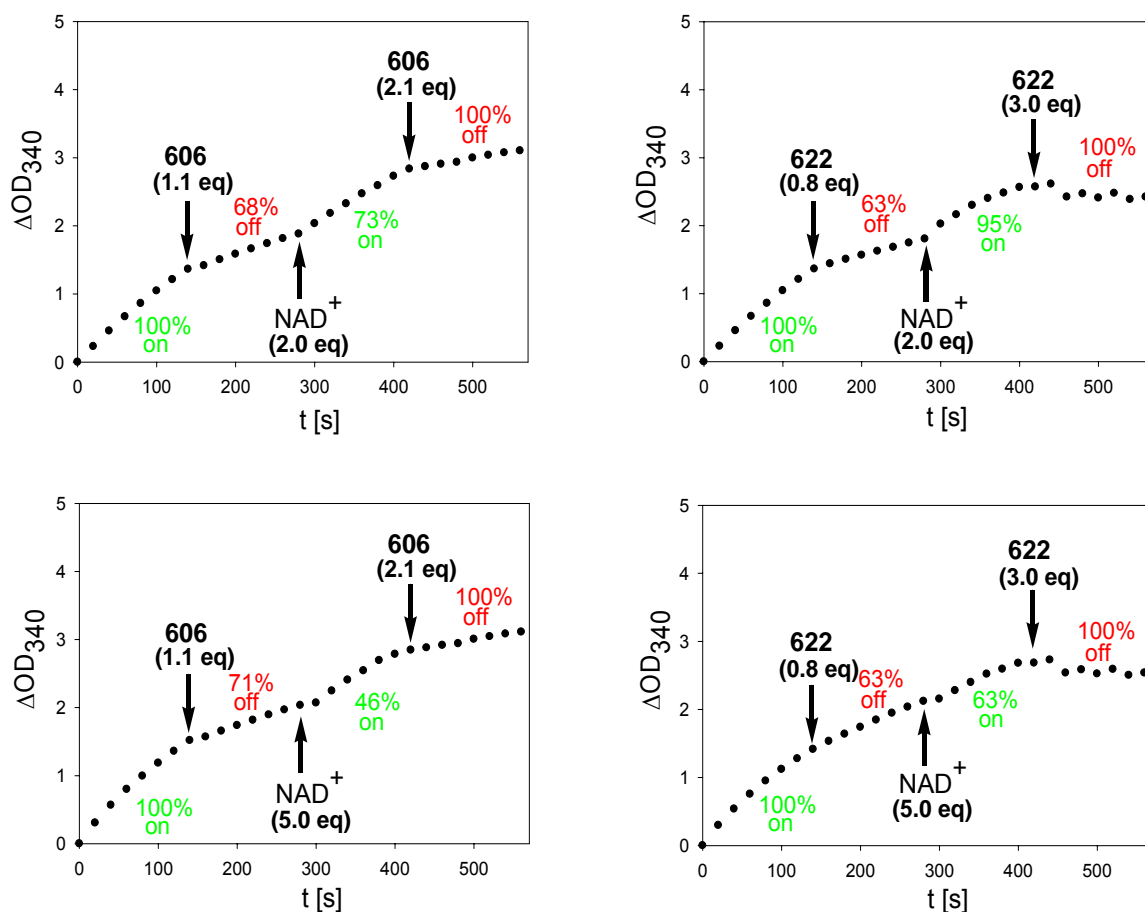


Abbildung 4.29: Inhibitions- und Reaktivierungseigenschaften der beiden Clips **606** und **622** bei Zugabe von zusätzlichem NAD^+ .

Nachdem nun eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass sich die Enzymaktivität nach vorausgegangener unvollständiger Inhibition sowohl für Clip **606** als auch für Clip **622** wieder anschalten lässt, sollte diese schließlich durch erneute Zugabe der Inhibitoren vollständig ausgeschaltet werden. In Abbildung 4.29 sind alle Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente der beiden Clips dargestellt.

4.2.2.5.3 Einfluss der Komponenten Tweezer 750 sowie Cofaktor NAD^+

Da die beiden Tweezer im Gegensatz zu den beiden Clips einem vom Cofaktor unabhängigen Hemm-Mechanismus folgen, sollte im Fall des Tweezers **750** die Enzymaktivität bei zuvor erfolgter 60%iger Inhibition durch Zugabe von zusätzlichem NAD^+ nicht beeinflusst werden. Wie man der Abbildung 4.30 entnehmen kann, trifft dies auch zu. Die Inhibition durch den Tweezer wird auch durch Zugabe von 9.14 mM NAD^+ in keiner Weise aufgehoben.

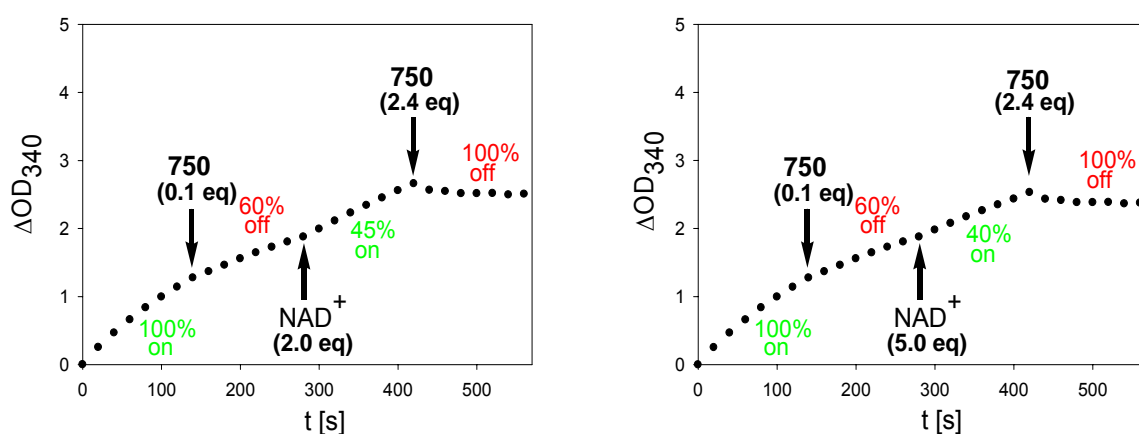
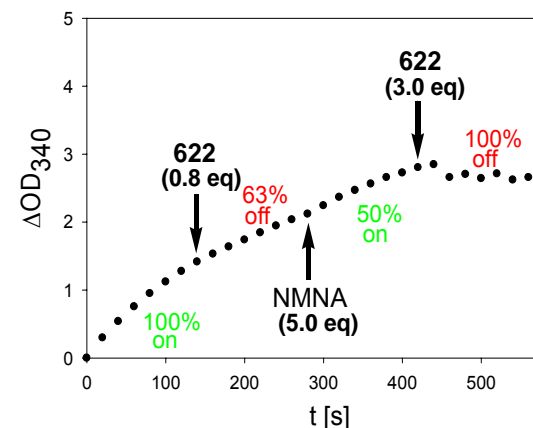
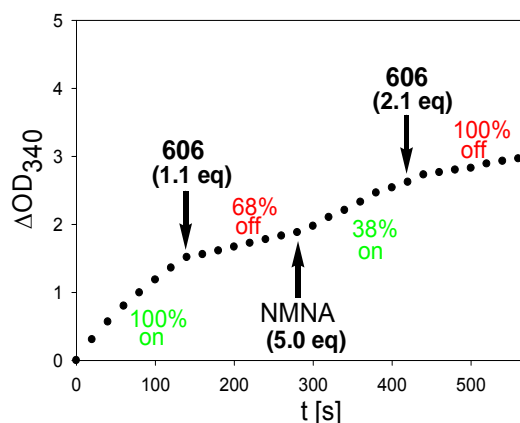
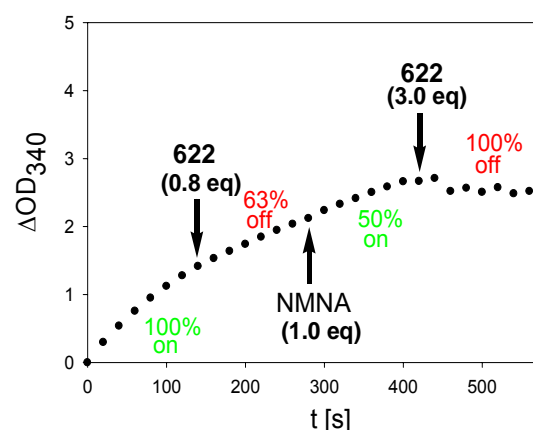
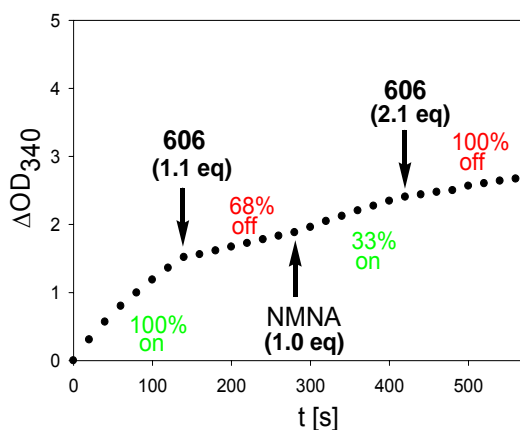


Abbildung 4.30: Inhibitions- und Reaktivierungsverhalten des Tweezers **750** bei Zugabe von zusätzlichem NAD^+ .

4.2.2.5.4 Einfluss der Komponenten Clip 606 und 622 sowie geeigneter Konkurrenz-Moleküle

Die nächste Teilaufgabe geht der Frage nach, ob durch den Einsatz geeigneter Konkurrenz-Moleküle bei vorausgegangener partieller Inhibition eine Steigerung bei der Rückgewinnung der ursprünglichen Enzym-Aktivität verglichen mit der Zugabe von zusätzlichem NAD^+ , möglich ist. Dazu wurde der ADH-Assay bis zur Reaktivierung der enzymatischen Reaktion

unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Anschließend erfolgte statt der Zugabe von zusätzlichem NAD^+ , die Zugabe der Konkurrenz-Moleküle *N*-Methylnikotinamidiodid (NMNA) und 2'-Deoxycytidin (DC). Wie man der Abbildung 4.31 entnehmen kann, ist eine Steigerung der Enzymaktivität nach vorausgegangener 70%iger ADH-Inhibition durch Zugabe beider Konkurrenz-Moleküle zwar möglich, allerdings deutlich schlechter im Vergleich zu NAD^+ . Für Clip **606** konnten durch Zugabe von NMNA lediglich 30% und für Clip **622** maximal 50% der ursprünglichen Enzymaktivität zurück gewonnen werden. Ein direkter Vergleich beider Konkurrenz-Moleküle miteinander zeigt, dass 2'-Deoxycytidin zur Reaktivierung der Enzymaktivität weniger geeignet ist, als *N*-Methylnikotinamidiodid. Während eine Zugabe von 1.83 mM (1 eq bzgl. NAD^+) NMNA ausreicht, um ca. 30% (Clip **606**) bzw. 50% (Clip **622**) der ursprünglichen Enzymaktivität wieder zu gewinnen, sind es im Fall von DC bei gleicher Konzentration nur 24% (Clip **606**) bzw. 45%(Clip **622**).



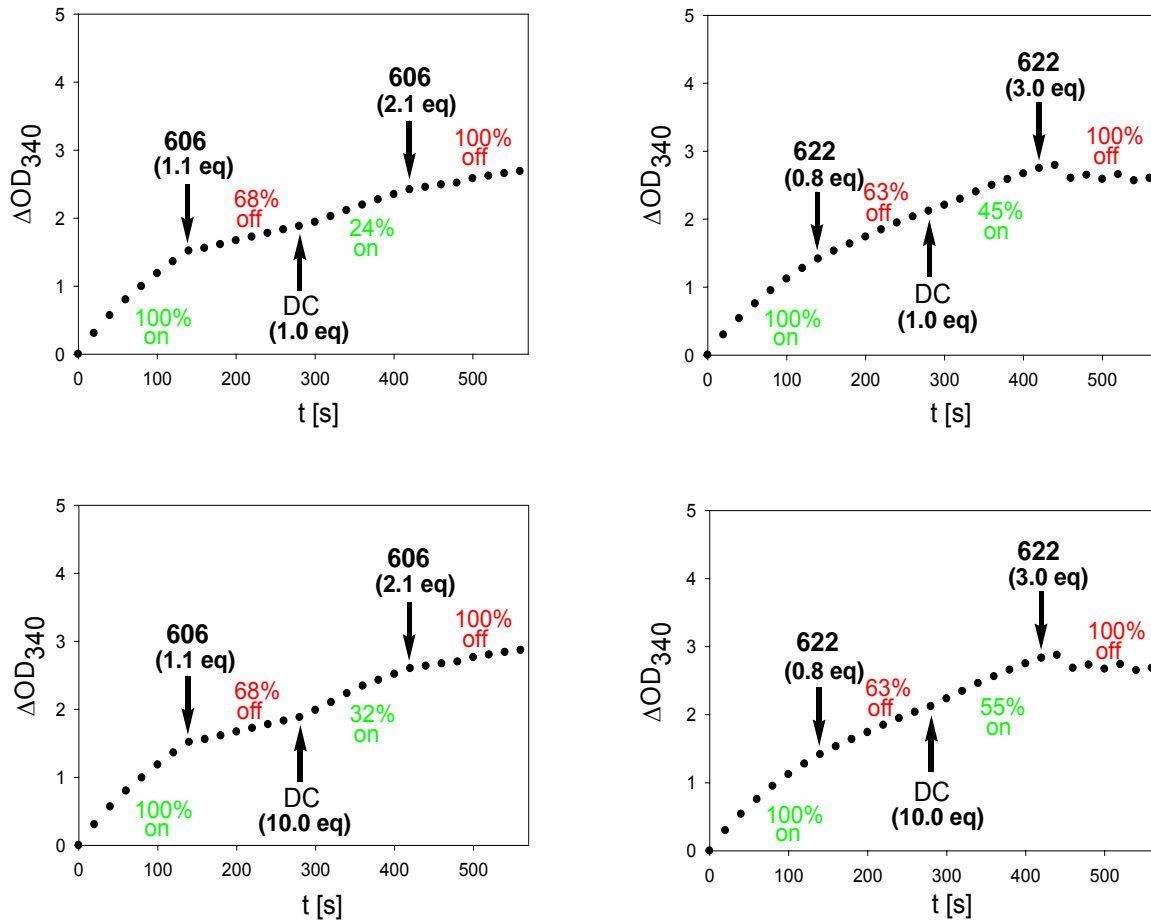


Abbildung 4.31: Inhibitions- und Reaktivierungsergebnisse der beiden Clips bei Zugabe der Konkurrenz-Moleküle *N*-Methylnikotinamidiodid (NMNA) und 2'-Deoxycytidin (DC).

Im Fall des Konkurrenz-Moleküls NMNA bestand die Möglichkeit, dass dieses aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu NAD^+ als NAD^+ -Mimetika fungiert und folglich Inhibition durch Blockierung der „Rossmann-Spalte“ induziert.^[111] Diese Vermutung konnte allerdings in einem zusätzlichen Experiment widerlegt werden. Dazu wurde der normale ADH-Assay einmal in Abwesenheit und einmal in Gegenwart von 1.83 mM NMNA (1 eq bzgl. NAD^+) durchgeführt. Ein Vergleich beider Assays zeigt, dass die enzymatische Reaktion durch die Anwesenheit von NMNA nicht im Geringsten beeinflusst wird. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass NMNA im Gegensatz zu NAD^+ nicht in der Lage ist, die enzymatische Oxidationsreaktion der ADH zu katalysieren. Dazu wurde der normale ADH-Assay statt mit 1.83 mM NAD^+ mit 1.83 mM NMNA durchgeführt. Wie man der Abbildung 4.32 entnehmen kann, findet in diesem Fall keine enzymatische Umsetzung statt.

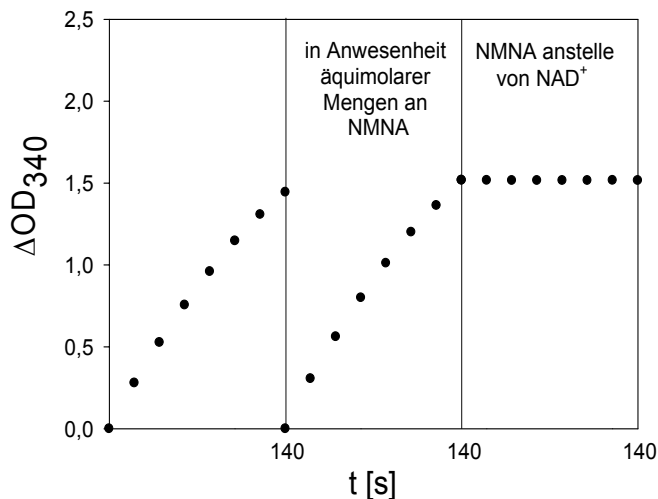


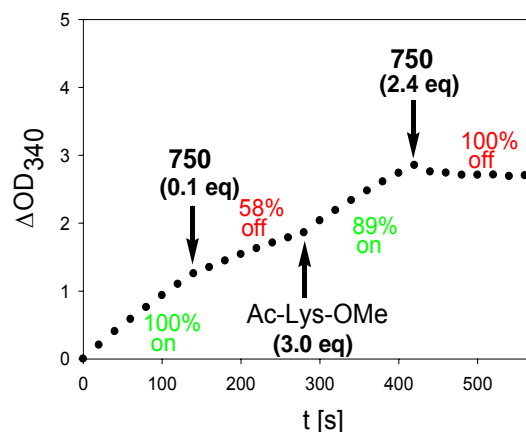
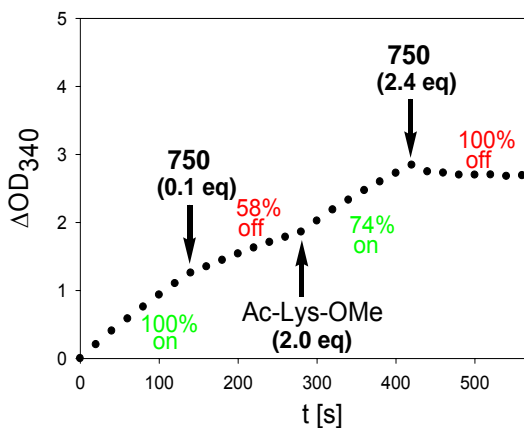
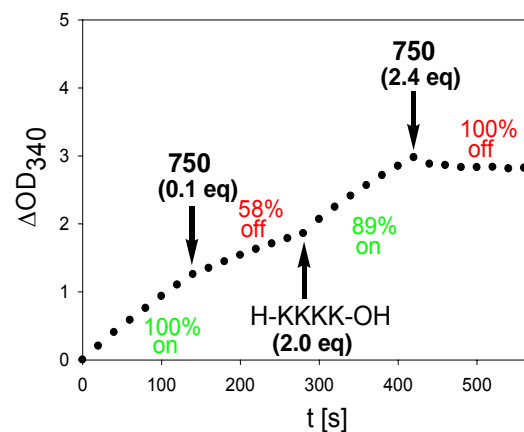
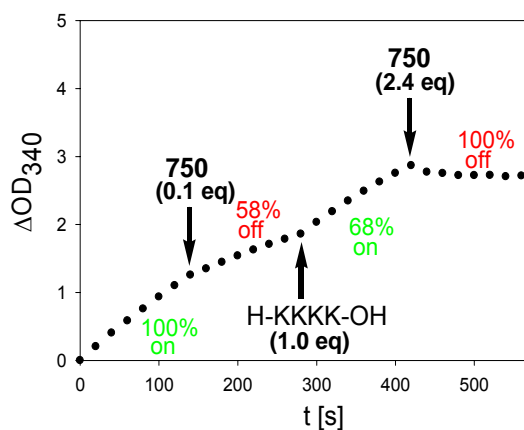
Abbildung 4.32: Einfluss von *N*-Methylnikotinamidioidid (NMNA) auf die enzymatische Aktivität der ADH. Links: normaler ADH-Assay; Mitte: normaler ADH-Assay in Anwesenheit von 1.83 mM NMNA, Rechts: normaler ADH-Assay mit 1.83 mM NMNA statt mit 1.83 mM NAD^+ .

4.2.2.5.5 Einfluss der Komponenten Tweezer 750 sowie geeigneter Konkurrenz-Moleküle

Im Fall des Tweezers **750** erfolgte die Durchführung der Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente analog zu denen der beiden Clips. Als Konkurrenz-Moleküle wurden allerdings hier zwei unterschiedliche Lysin-Derivate, zum einen das geschützte Lysin Ac-Lys-OMe, zum anderen das Tetra-Lysin H-KKKK-OH eingesetzt.

Wie man der Abbildung 4.33 entnehmen kann, lässt sich die Enzymaktivität der ADH bei vorausgegangener 60%iger Inhibition durch Zugabe beider Konkurrenz-Moleküle nahezu vollständig wiederherstellen. Während sich im Fall des geschützten Lysins Ac-Lys-OMe eine Konzentration von 5.48 mM (3 eq bzgl. NAD^+) als besonders günstig erwies, konnte im Fall des Tetra-Lysins H-KKKK-OH die gleiche 90%ige Rückgewinnung der ursprünglichen Enzymaktivität bereits mit einer Konzentration von 3.66 mM (2 eq bzgl. NAD^+) erzielt werden. Wie schon zuvor bei den beiden Clips beobachtet werden konnte, führte auch hier die Zugabe einer höheren Konkurrenz-Molekül-Konzentration bis zu 18.3 mM (10 eq bzgl. NAD^+) zu keiner Steigerung der Enzymaktivität, sondern trug eher zum gegenteiligen Effekt bei. Im Fall des geschützten Lysins wurde sogar eine um 25% geringere Enzymaktivität beobachtet als bei einer Konzentration von 5.48 mM (3 eq bzgl. NAD^+). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das Enzym durch die Anwesenheit zu vieler Moleküle in

seiner enzymatischen Aktivität negativ beeinflusst wird. Nachdem auch hier gezeigt werden konnte, dass sich die ADH-Inhibition durch Zugabe geeigneter Konkurrenz-Moleküle wieder aufheben lässt, wurde diese anschließend durch weitere Zugabe von 4.39 mM (2.4 eq bzgl. NAD^+) Tweezer **750** vollständig ausgeschaltet. Im Gegensatz zu den beiden Clips war allerdings hier die Möglichkeit gegeben, dass sich im Fall einer vorausgegangenen vollständigen Inhibition durch Tweezer **750** (0.6 eq bzgl. NAD^+), noch bis zu 40% der ursprünglichen Enzymaktivität durch Zugabe von 5.48 mM (3 eq bzgl. NAD^+) des Konkurrenz-Moleküls Ac-Lys-OMe zurückgewinnen ließen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass es sich bei der Komplexierung der auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenreste durch den Tweezer **750** um einen reversiblen Prozess handelt. Folglich kann das Gleichgewicht durch Zugabe externer Lysin-Derivate auf die Seite des freien Enzyms verschoben werden.



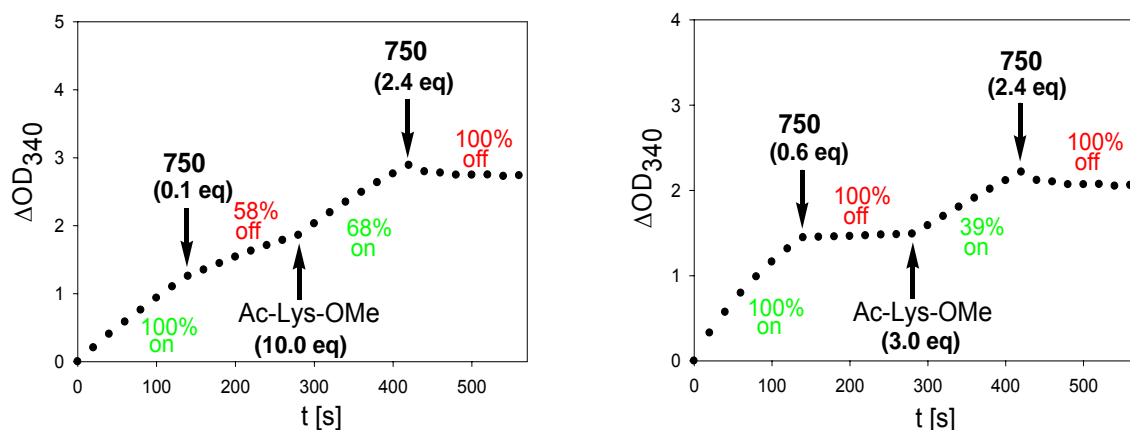


Abbildung 4.33: Inhibitions- und Reaktivierungsverhalten des Tweezers **750** bei Zugabe der Konkurrenz-Moleküle H-KKKK-OH und Ac-Lys-OMe. Im Gegensatz zu den beiden Clips ist hier sogar bei vorausgegangener vollständiger Enzyminhibition durch Zugabe von 0.6 eq Tweezer **750** bzgl. NAD^+ eine bis zu 40%ige Rückgewinnung der ursprünglichen Enzymaktivität möglich (rechts unten).

In einer weiteren Reihe der Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente konnte eindeutig belegt werden, dass das Ausmaß der Rückgewinnung der ursprünglichen enzymatischen Aktivität mit der Affinität der dafür geeigneten Aminosäuren gegenüber dem Tweezer korreliert. Dazu wurden insgesamt sieben basische, saure und unpolare Aminosäure-Derivate untersucht. Nach vorausgegangener vollständiger ADH-Inhibition durch den Tweezer **750** (0.6 eq bzgl. NAD^+) wurden dem ADH-Assay jeweils 5.48 mM (3 eq bzgl. NAD^+) der entsprechenden Aminosäure hinzugefügt. Die daraus resultierenden Geschwindigkeiten wurden mit der Anfangsgeschwindigkeit v_0 in Beziehung gesetzt, um so Rückschlüsse auf das Potential der einzelnen Aminosäuren hinsichtlich der enzymatischen Rückgewinnung ziehen zu können. Die Messungen wurden insgesamt viermal wiederholt und anschließend die Mittelwerte gebildet. Wie man dem Diagramm 4.1 entnehmen kann, stimmen die relativen Reaktivierungseffekte, die mit den jeweiligen Aminosäuren hinsichtlich der wiederhergestellten ADH-Aktivität erzielt werden konnten, recht gut mit ihren relativen Affinitäten gegenüber dem Tweezer **734** überein.^[80] Von allen untersuchten Aminosäuren wird Lysin am stärksten durch die beiden Tweezer komplexiert, und weist folglich den größten Rückgewinnungseffekt nach vorausgegangener vollständiger Inhibition auf. So lassen sich z. B. durch Zugabe von 5.48 mM (3 eq bzgl. NAD^+) des Lysin-Derivats Ac-Lys-OMe ca. 50 % der ursprünglichen Enzymaktivität wieder zurück gewinnen. Im Fall von Arginin sind es dagegen nur noch ca. 30 %. Dies lässt sich mit der niedrigeren Bindungskonstante von Arginin erklären. Die restlichen fünf Aminosäuren eignen sich aufgrund ihrer

vernachlässigbar kleinen Bindungskonstanten nicht zur Reaktivierung der Enzymaktivität. Sie weisen, wenn überhaupt, nur minimale Rückgewinnungseffekte auf.

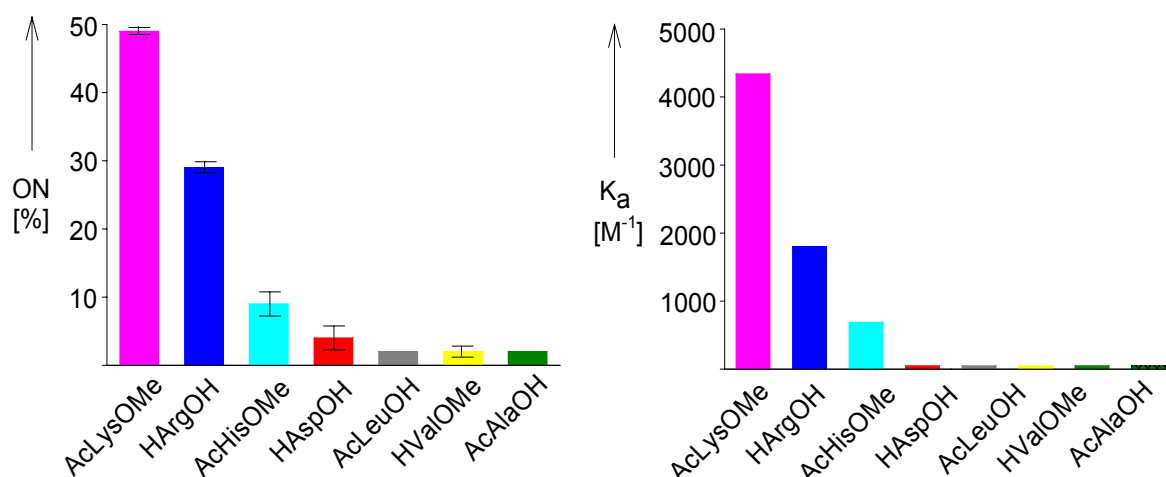


Diagramm 4.1: Links: Prozentuale Rückgewinnungswerte der jeweiligen zugegebenen Aminosäuren nach vorausgegangener vollständiger ADH-Inhibition. Rechts: Die für Tweezer **734** mittels 1H -NMR-Verdünnungstitation ermittelten Bindungskonstanten.

Mit Hilfe der Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente konnte ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den beiden Hemm-Mechanismen aufgedeckt werden. Im Fall des Tweezers **750** verläuft die Komplexbildung der Lysin-Reste auf der Proteinoberfläche reversibel. Durch Zugabe externer Lysin-Derivate lässt sich das Gleichgewicht auf die Seite des freien Enzyms verschieben. Für Clip **622** scheint dagegen ein dualer Hemm-Mechanismus vorzuliegen. Dieser beinhaltet neben dem Cofaktor-Abfang eine partiell irreversible Hemmung durch Enzym-Denaturierung. Deren Ursprung könnte in der Bindung des Clips **622** an basische Domänen auf der Proteinoberfläche, unter anderem der leeren „Rossmann Fold“, begründet liegen. Denkbar wäre, dass durch diesen Enzym-Inhibitor-Komplex die für die enzymatische Umsetzung essentielle Konformationsänderung nicht mehr möglich ist und folglich Inhibition induziert. Dieser zusätzliche inhibitorische Effekt des Clips **622** konnte mit Hilfe der Circular dichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie) eindeutig aufgeklärt werden.

Mit der CD-Spektroskopie lässt sich die Chiralität einer Verbindung direkt nachweisen. α -helicale Bereiche der Proteine zeigen dabei ein sehr viel stärkeres Signal im kurzwelligen UV-Bereich auf als die β -Faltblatt-Bereiche. Der langwellige UV/Vis-Bereich eines CD-Spektrums liefert dagegen gute Hinweise dafür, ob eine korrekte, d. h. native oder denaturierte Faltung eines Proteins vorliegt.

4.2.2.6 Untersuchungen mit der Circular dichroismus-Spektroskopie

4.2.2.6.1 Grundlagen

Die Circular dichroismus-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie im UV/Vis-Bereich.^[112-116] Mit ihrer Hilfe lassen sich die Konformationen von Polypeptiden und anderer chiraler Stoffe aufklären. Der Circular dichroismus beruht auf der unterschiedlichen Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht durch eine asymmetrische Probe. Beim Durchdringen einer chiralen Verbindung werden die zirkular polarisierten Lichtstrahlen wellenlängenabhängig in ihrer Polarisationsrichtung gedreht (optische Rotationsdispersion, ORD) und unterschiedlich stark absorbiert. Der austretende Lichtstrahl wird dabei in der Einheit molare Elliptizität Θ angegeben. Diese dient als Maß für die unterschiedliche Schwächung des rechts und links zirkular polarisierten Lichtes beim Durchdringen einer optisch aktiven Verbindung. Der Circular dichroismus der Proteine beruht auf den strukturbestimmenden asymmetrischen Elementen im Bereich des Peptidrückgrats sowie auf den chiralen Aminosäuren. Mit der Ausnahme von Glycin verfügen alle Aminosäuren über ein der Peptidgruppe benachbartes asymmetrisches C_α -Atom. Durch dieses C_α -Atom wird eine Asymmetrie in der Elektronenkonfiguration der Peptidbindung hervorgerufen. Die Folge ist eine unterschiedliche Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht. Proteine sind damit intrinsisch optisch aktiv. Des Weiteren wird die Elektronenkonfiguration der Peptidbindungen insbesondere von den Sekundärstrukturen bestimmt. Jeder Sekundärstrukturanteil trägt einen eigenen Anteil zum CD-Spektrum des Proteins bei. Der Circular dichroismus aromatischer Aminosäuren, die in Lösung keine asymmetrischen Eigenschaften aufweisen, ist auf die Induktion einer asymmetrischen Elektronenkonfiguration durch die benachbarten Aminosäuren zurückzuführen.

Die CD-Spektren der Proteine weisen zwei charakteristische Spektralbereiche auf. Der erste Spektralbereich, auch als Peptidbereich bekannt, umfasst die Wellenlängen 160 nm bis 230 nm. Im zweiten Spektralbereich, der sich über die Wellenlängen 240 nm bis 300 nm erstreckt, lassen sich die CD-Effekte aromatischer Aminosäuren detektieren. α -Helices, β -Faltblattstrukturen und zufällig verknäuelte Proteine (random coils) verfügen alle über ein charakteristisches CD-Spektrum. Das CD-Spektrum einer α -Helix weist z. B. zwei ausgeprägte negative CD-Banden bei 208 nm und 222 nm und eine positive Bande bei 192 nm auf. Dagegen besitzt eine zufällig gefaltete Polypeptidkette eine negative CD-Bande bei 190 nm.

4.2.2.6.2 Durchführung der CD-spektroskopischen Untersuchungen

Zunächst wurde das CD-Spektrum des nativen Proteins und anschließend das einer künstlich denaturierten ADH aufgenommen. Diese CD-Spektren sollten später als Vergleich dienen, um die Auswertung der ADH-Spektren in Gegenwart der Inhibitoren zu erleichtern. Da der UV/Vis-Bereich, der zum Nachweis einer potentiellen Denaturierung der ADH in Gegenwart der entsprechenden Inhibitoren wichtig sein könnte unbekannt war, wurden mehrere Messungen bei unterschiedlichen ADH- und Inhibitorkonzentrationen im Wellenlängenbereich zwischen 200 und 300 nm durchgeführt. Laut Literatur sollten die CD-Spektren im Bereich zwischen 200 und 250 nm für Carbonyl-Gruppen und zwischen 250 und 300 nm für die aromatischen Aminosäurenreste Phenylalanin (257 nm), Tyrosin (274 nm) und Tryptophan (280 nm) charakteristisch sein. Während der Messungen stellte sich heraus, dass zur Bestimmung der einzelnen UV/Vis-Bereiche nur ganz bestimmte ADH-Konzentrationen geeignet waren. Für den Bereich 200 bis 250 nm musste die ADH-Konzentration zwischen $5 \cdot 10^{-6}$ und $5 \cdot 10^{-7}$ M gewählt werden. Im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 300 nm durfte dagegen die ADH-Konzentration nur innerhalb der Grenzen $5 \cdot 10^{-5}$ M bis $5 \cdot 10^{-6}$ M variiert werden. Die Inhibitorkonzentrationen wurden in beiden Fällen so gewählt, dass sie nicht größer als 10^{-5} M waren. Nur unter diesen Bedingungen war eine zuverlässige Auswertung der CD-Spektren möglich. Alle CD-Messungen wurden in einer UV/Vis-durchlässigen Quarzküvette mit einer Schichtdicke $d = 1$ cm bei Raumtemperatur in Natrium-Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7.69$) am CD-Spektrometer durchgeführt. Die ADH-Konzentration betrug bei allen Messungen stets 100 nM. Um einen Vergleich für die möglicherweise durch die Inhibitoren verursachte Denaturierung zu erlangen, sollte, wie zuvor erwähnt, das CD-Spektrum einer künstlich induzierten ADH-Denaturierung aufgenommen werden. Dazu wurden drei unterschiedliche Varianten in Betracht gezogen, die Hitze-Denaturierung, die Säure-Denaturierung und die durch Detergenzien verursachte Denaturierung.^[13, 82]

Das Prinzip der Hitze-Denaturierung besteht darin, durch hohe Temperaturen eine strukturelle Veränderung des Proteins herbeizuführen. Dabei hängt die für die Denaturierung erforderliche Temperatur stark vom Organismus ab. Thermophile Bakterien, die in heißen Quellen bei ca. 100 °C leben, enthalten z. B. äußerst hitzestabile Proteine, die auch unter solchen Temperaturbedingungen enzymatische Aktivität zeigen. Für alle Denaturierungsvorgänge gilt, dass unter den jeweiligen Bedingungen keine kovalenten Bindungen gespalten werden. Damit bleibt die Kettenstruktur und Abfolge der Bausteine, die so genannte Primärstruktur erhalten.

Durch die Energiezufuhr werden allerdings die einzelnen Nukleotide und Aminosäuren, aus denen die Proteine bestehen, so stark in Schwingungen versetzt, dass ihre nicht-kovalenten Bindungskräfte, zu denen hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen zählen, verloren gehen. Es folgt eine Veränderung der Sekundär- und Tertiärstrukturen, die sowohl für den Verlust der enzymatischen Aktivität als auch für die geringere Löslichkeit der Enzyme verantwortlich sind. Letzteres macht sich oft als „Ausflocken“ oder „Gerinnung“ bemerkbar. Die Hitze-Denaturierung kann bis zu einem gewissen Grad reversibel verlaufen. Dies ist allerdings nur unter der Bedingung möglich, dass noch keine gravierenden strukturellen Veränderungen eingetreten sind. Bei dem folgenden Versuch waren genau diese Bedingungen gegeben. Dazu wurde die ADH vor der Messung 30 Minuten lang einer Temperatur von 50 °C ausgesetzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Beide CD-Spektren, vor und nach der Temperatureinwirkung, zeigen einen identischen Verlauf. Das CD-Spektrum, das allerdings zur Zeit dieser Temperatureinwirkung bei 50 °C aufgenommen wurde, weist dagegen eine deutlich geringere Intensität auf. Es liegt also eine Denaturierung vor. Wie allerdings gezeigt werden konnte, ist diese Denaturierung reversibel. Eine Hitzbehandlung der ADH bei 100 °C mit anschließendem Abschrecken auf 0 °C führt dagegen zu einer irreversiblen Denaturierung. In diesem Fall führt wahrscheinlich der Verlust der Struktur in einem Teil des Proteins zur Destabilisierung zusätzlicher Teile, was sich in einer irreversiblen Denaturierung äußert. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Abbildung 4.34 aufgeführt.

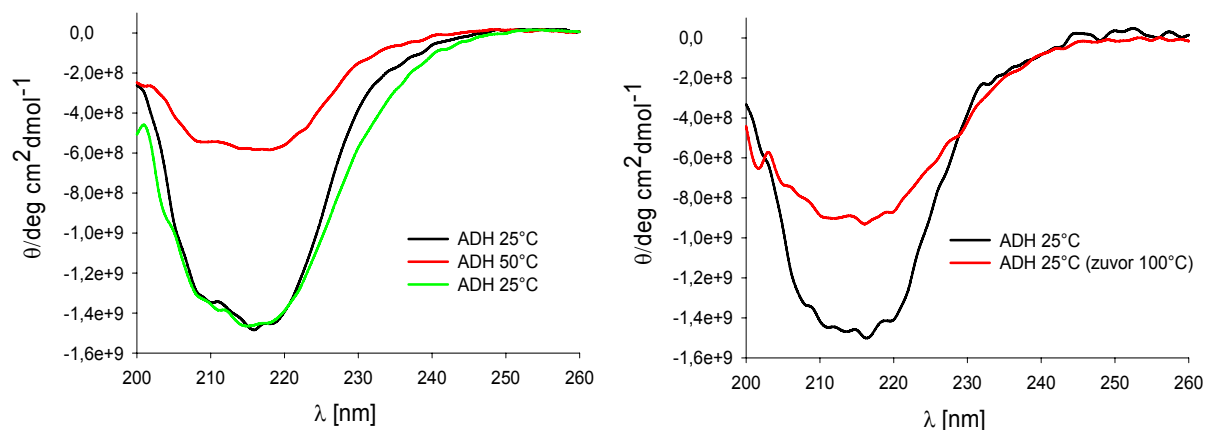


Abbildung 4.34: CD-Spektren künstlich induzierter ADH-Denaturierungen durch Hitze. Links: Bei 50 °C findet noch eine reversible Denaturierung statt. Rechts: Bei 100 °C erfolgt dagegen eine irreversible Denaturierung.

Das Prinzip der Säure-Denaturierung beruht dagegen darauf, dass extreme pH-Werte zu einer Änderung der Nettoladung des Proteins führen. Durch diese Ladungsänderung kommt es zu

einer elektrostatischen Abstoßung und zum Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen. Daher wurde in diesem Fall die ADH-Lösung durch Zugabe von 1 M HCl auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Das resultierende CD-Spektrum, das in Abbildung 4.35 links dargestellt ist, zeigt im Vergleich zur Hitze-Denaturierung nicht nur eine Intensitätsabnahme, sondern auch eine strukturelle Veränderung.

Das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) induziert Denaturierung, indem es die hydrophoben Wechselwirkungen auflöst, die den stabilen Kern globulärer Proteine zusammenhalten. In diesem Zusammenhang wurde einer nativen ADH-Lösung eine 1 M SDS-Lösung hinzu gegeben. Das erhaltene CD-Spektrum weist eine deutliche strukturelle Änderung auf, die sich in einer Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen und Zuspitzung des Maximums äußert (Abbildung 4.35, rechts).

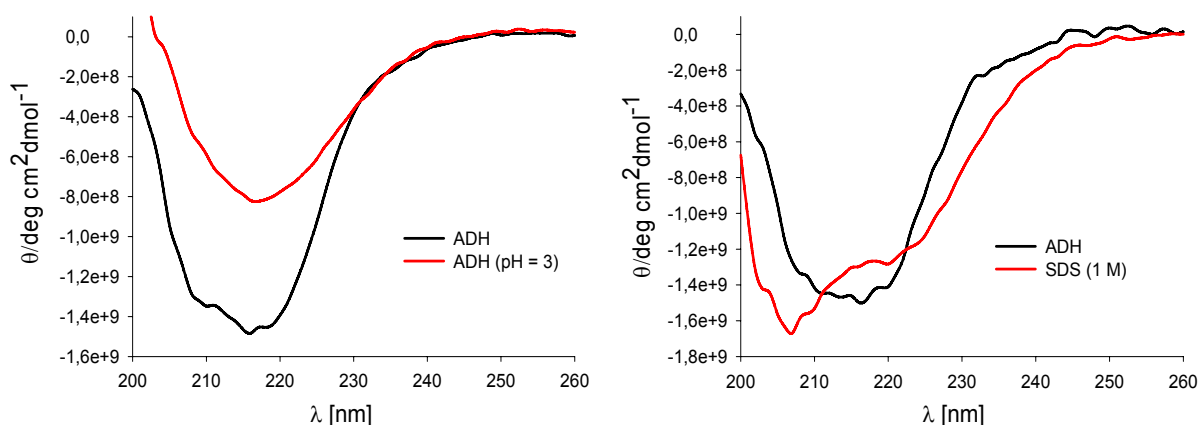


Abbildung 4.35: CD-Spektren künstlich induzierter ADH-Denaturierungen durch Säure (links) bzw. durch das Detergenz SDS (rechts).

Nachdem nun geklärt war, wie sich der Unterschied zwischen nativer und denaturierter ADH in den einzelnen CD-Spektren äußert, folgten die Untersuchungen der ADH in Gegenwart des Clips **622** und des Tweezers **750**. Dazu wurde eine Küvette vermessen, die 100 nM ADH und 1 μM Clip bzw. Tweezer enthielt. Wie man den CD-Spektren in der Abbildung 4.36 entnehmen kann, ist der Anstieg der negativen Elliptizität im Fall beider ADH-Inhibitor-Komplexe deutlich geringer, verglichen mit dem des reinen Enzyms.

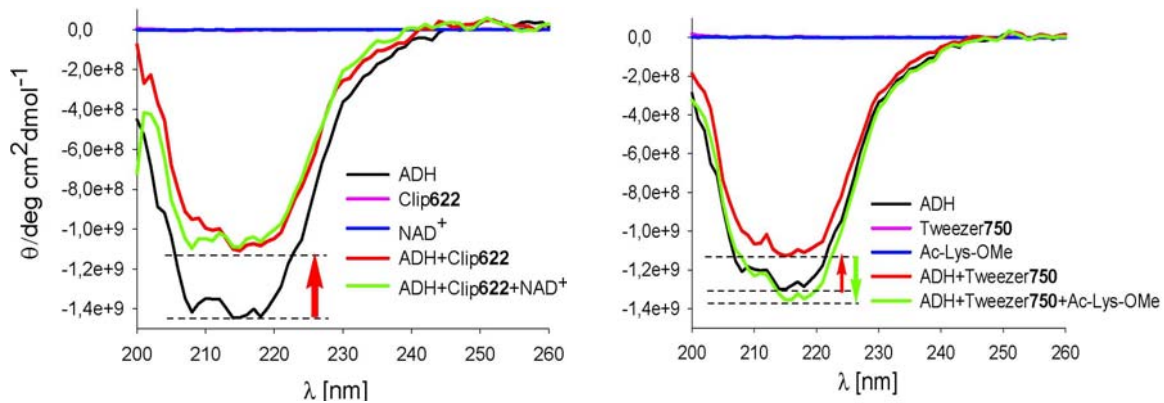


Abbildung 4.36: Links: CD-Spektren des Clips **622**.. Rechts: CD-Spektren des Tweezers **750**.

Dies deutet daraufhin, dass sowohl durch den Clip als auch durch den Tweezer Denaturierung induziert wird. Dass es sich hierbei um unterschiedliche Arten der Denaturierung handelt, konnte durch Zugabe der entsprechenden Konkurrenz-Moleküle geklärt werden. Im Fall des Clips **622** wurde hierzu ein zehnfacher Überschuss an Cofaktor NAD^+ in die Küvette gegeben. Wie man dem resultierenden CD-Spektrum entnehmen kann, lässt sich das CD-Spektrum der nativen ADH nicht mehr zurückgewinnen. Es liegt folglich eine irreversible Denaturierung vor. Dies bestätigt den zuvor postulierten dualen Hemm-Mechanismus des Clips **622**.^[117]

Auch im Fall des Tweezers **750** kann zunächst eine Denaturierung festgestellt werden. Im Gegensatz zum Clip lässt sich allerdings hier durch Zugabe des zehnfachen Überschusses an Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe das CD-Spektrum der nativen ADH zurückgewinnen. Dies bestätigt ebenfalls den bei den Inhibitions- und Reaktivierungsexperimenten beobachteten reversiblen Prozess. Alle im CD-Spektrum der ADH zuvor beobachteten signifikanten Änderungen, die auf die Bindung des Tweezers an das Enzym zurückzuführen sind, lassen sich durch Zugabe von Ac-Lys-OMe vollständig rückgängig machen. Vermutlich führt die Komplexbildung der auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurereste durch den Tweezer zu einer Konformationsänderung der ADH. Diese nicht-kovalente Denaturierung lässt sich allerdings durch anschließende externe Zugabe von Lysin vollständig aufheben, wie sich in dem wiederhergestellten CD-Spektrum der nativen ADH zeigt.

Wie aus den CD-spektroskopischen Untersuchungen hervorgeht, bilden beide Inhibitoren, Clip **622** und Tweezer **750**, mit der ADH einen Enzym-Inhibitor-Komplex. Beide Komplexe konnten mittels nicht-denaturierender Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden.

4.2.2.7 Untersuchungen mit der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese

4.2.2.7.1 Grundlagen

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode der Chemie und Molekularbiologie zur Trennung von Stoffgemischen.^[12, 13, 118, 119] Das Prinzip dieser Methode beruht auf der unterschiedlich schnellen Wanderungsgeschwindigkeit geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit v , mit der sich ein geladenes Teilchen bei der Elektrophorese bewegt, ergibt sich aus dem Produkt der Feldstärke E und der Beweglichkeit U . Damit ist die Geschwindigkeit v des Teilchens proportional der angelegten Feldstärke E und der Gesamtladung Q des Moleküls, aber umgekehrt proportional seiner Größe $6 \cdot \pi \cdot r$ und der Viskosität η der Lösung. (Gleichung 21)

$$v = U \cdot E = \frac{Q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (21)$$

v : Wanderungsgeschwindigkeit
 U : elektrophoretische Beweglichkeit
 E : elektrische Feldstärke
 Q : elektrische Ladung des Teilchens
 r : Radius des Teilchens
 η : Viskosität des Mediums

Aufgrund der unterschiedlichen Ladung und Geometrie der Moleküle, wandern diese unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in einem bestimmten Zeitintervall unterschiedlich weit. Da während der Elektrophorese überwiegend elektrostatische Kräfte auf die Moleküle einwirken, stellt die Gelelektrophorese eine schonende Trennmethode für empfindliche Substanzen, wie z. B. Proteine dar. Durch den Einsatz geeigneter Trägermaterialien mit hoher Viskosität und definierter Porengröße, wie z. B. Agarose- und Polyacrylamid-Gele, lässt sich der Trenneffekt nach Molekülgröße beliebig erhöhen. Die aus den Gelen gebildeten engmaschigen Netze beeinträchtigen dabei die Wanderung größerer Moleküle stärker als die kleinerer Moleküle. Im Gegensatz zu den Polyacrylamid-Gelen (3-6 nm) sind die Agarose-

Gele relativ großporig (150 nm bei 1%igen Gelen, 500 nm bei 0.16%igen Gelen). Diese eignen sich daher gut zur Trennung von DNA und hochmolekularer Proteine. Je nach Variation des Polymergehaltes des Gels kann dessen Viskosität bzw. Vernetzungsgrad variiert und dem jeweils benötigten Größentrennbereich angepasst werden. Eine hohe Agarosekonzentration trägt z. B. zur Bildung kleinerer Poren bei. Es wird zwischen denaturierender und nicht-denaturierender Gelelektrophorese unterschieden. Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) zählt zu der denaturierenden Variante. Als Trennmedium dient hier ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Der Zusatz des Detergens SDS trägt zur Denaturierung des Proteins bei, indem es die Eigenladung des Proteins überdeckt. 1.4 g SDS lagern sich dabei ungefähr an 1 g Protein an. Die Folge ist eine konstante Ladungsverteilung. Im Gegensatz zur SDS-PAGE findet die native Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen statt. Auf diese Weise bleiben die physiologischen Eigenschaften unter anderem die bestehenden Ladungen der aufzutrennenden Proteine erhalten. Die native Gelelektrophorese eignet sich damit zum Nachweis relevanter Konformationen (Monomere, Dimere, Trimere, Tetramere) und Komplexbildungen.

4.2.2.7.2 Durchführung der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese

Für die Durchführung der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarose-Gel in 5 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH = 7.04) vorbereitet. Durch die Platzierung eines Kamms in der Mitte der Gel-Kammer, konnten mehrere Wells für die Untersuchungen erhalten werden. Diese wurden anschließend mit den entsprechenden Komponenten befüllt. Das Gesamtvolumen betrug dabei jeweils 33 µL/ Well. Abbildung 4.37 zeigt die für eine nicht-denaturierende Gelelektrophorese benötigte Apparatur sowie die dafür erforderlichen einzelnen Arbeitsschritte. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur, wurden diese anschließend bei 35 mA innerhalb von 1 bis 2 Stunden getrennt. Danach wurden die Gele 15 Minuten lang mit einer wässrigen Lösung, bestehend aus 0.5% Coomassie Blau, 40% Methanol und 10% Essigsäure, angefärbt und kurz darauf mit bi-dist. Wasser über Nacht entfärbt. Sobald die Banden auf dem Gel deutlich zu erkennen waren, wurden diese auf einem Flachbrett-Scanner eingescannt.

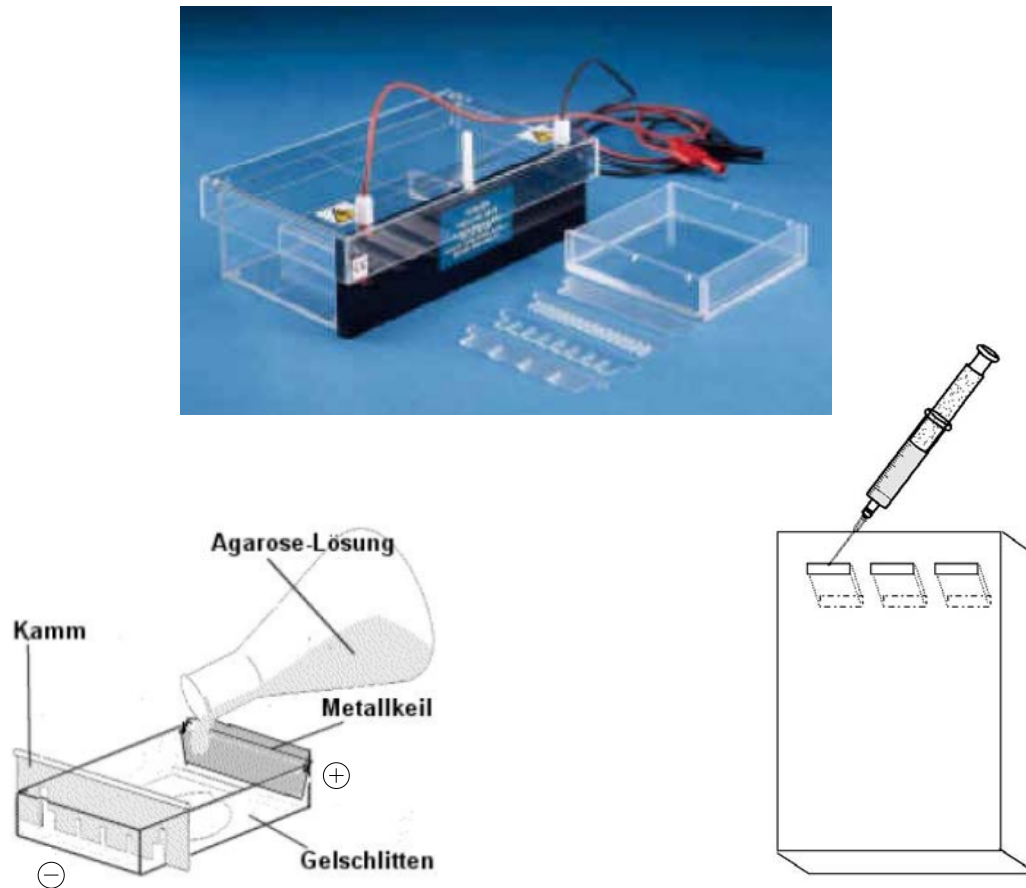


Abbildung 4.37: Apparatur zur Durchführung einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese bestehend aus Gelkammer, Gelgießform und Kamm (oben). Zubereitung des Agarosegels in der Gelkammer (unten links) sowie Befüllung der einzelnen Kammern mit dem zu trennenden Stoffgemisch (unten rechts).^[118]

Bei der untersuchten YADH handelte es sich um ein schwach basisches Protein mit einem $pI \approx 8$. Daher sollte das freie Enzym in Richtung Kathode ((-)-Pol) wandern. Die Migration der Inhibitoren sollte dagegen aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphonat- bzw. Phosphat-Substituenten in Richtung Anode ((+)-Pol) erfolgen. Wenn sich nun der entsprechende Protein-Inhibitor-Komplex bildet, dann sollte dieser im Gegensatz zur freien ADH nicht in Richtung Kathode, sondern in Richtung Anode migrieren. Der Grund dafür ist eine durch die an der ADH gebundenen Inhibitor-Moleküle hervorgerufene zunehmend negative Ladungs-Überkompensation auf der Proteinoberfläche.

Die beiden Abbildungen 4.38 und 4.39 zeigen die eingescannten Gele mit deren Banden, die sich für das native Enzym ADH, die reinen Inhibitoren und die jeweiligen ADH-Inhibitor-Komplexe nach unterschiedlichen Trennzeiten ergaben.

Für die beiden Clips **606** und **622** lassen sich bereits nach einer Stunde Trennzeit Banden für die möglichen Protein-Clip-Komplexe erkennen. Der ADH-Clip **606**-Komplex scheint dabei weniger stabil zu sein, da noch eine recht deutliche Aufspaltung der reinen ADH- und Clip **606**-Banden im Kathoden- bzw. Anoden-Bereich zu sehen ist. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Bindung zwischen den Clip **606**-Molekülen und der ADH-Oberfläche zu gering ist, um die erforderliche Ladungs-Überkompensation hervorrufen zu können. Allerdings scheint auch der entsprechende ADH-Clip **622**-Komplex recht schwach zu sein, da beide Protein-Clip-Komplexe nach einer zweistündigen Trennzeit zerfallen. Als Folge daraus wandern die freien Clips wieder zur Anode und das freie Enzym zur Kathode.

Für die beiden Tweezers **734** und **750** können ebenfalls nach einer Stunde Trennzeit Banden für die möglichen Protein-Tweezer-Komplexe beobachtet werden. Die recht deutliche Aufspaltung der reinen ADH- und Tweezer **734**-Banden gibt Anlass zur Vermutung, dass der Phosphonat-substituierte Tweezer einen schwächeren Komplex mit der ADH bildet als der Phosphat-substituierte Tweezer. Im Gegensatz zu den beiden Protein-Clip-Komplexen erfolgt allerdings hier nach zwei Stunden Trennzeit keinerlei Dissoziation der Komplexe. Stattdessen migrieren beide Protein-Tweezer-Komplexe deutlich in Richtung Anode. Dies ist ein Zeichen für eine negative Ladungs-Überkompensation der ADH-Proteinoberfläche, die durch die vollständige Absorption der negativ geladenen Tweezer-Moleküle hervorgerufen wird.

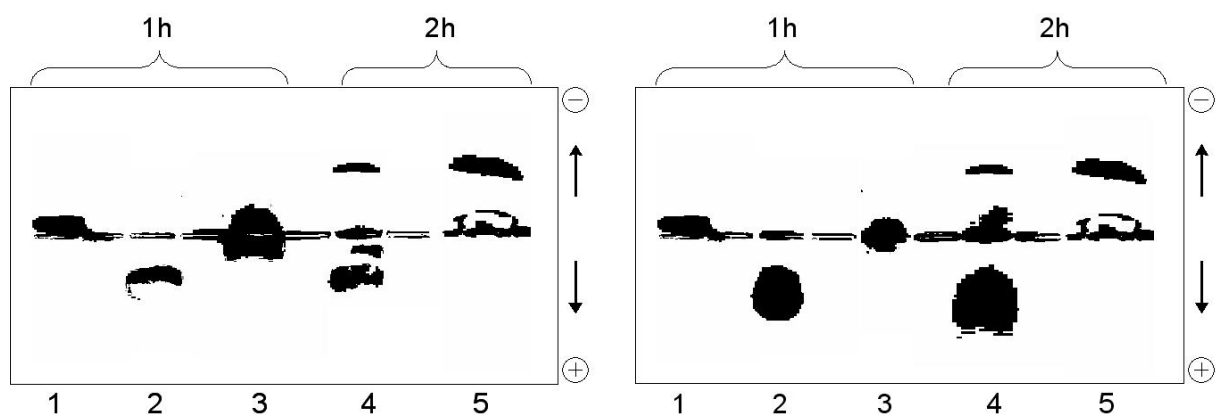


Abbildung 4.38: Nicht-denaturierende Gelelektrophorese der beiden Clips **606** (links) und **622** (rechts). 1: ADH (191 μ M); 2: Clip **606** bzw. **622** (66.4 mM); 3: ADH (95.5 μ M)·Clip (33.2 mM); 4: ADH (95.5 μ M)·Clip (33.2 mM); 5: ADH (191 μ M). Die beiden nicht-denaturierenden Agarose-Gele zeigen, dass das schwach basische Protein (1) in Richtung Kathode wandert, während die beiden entgegengesetzt geladenen Clips **606** (links (2)) und **622** (rechts (2)) in Richtung Anode wandern. Nach 1 h Trennzeit hat sich das Enzym an die beiden Clips gebunden und deren negativen Ladungen neutralisiert (3). Nach 2 h Trennzeit zerfällt allerdings dieser schwache Komplex und die beiden Komponenten wandern wieder in entgegengesetzte Richtungen (4).

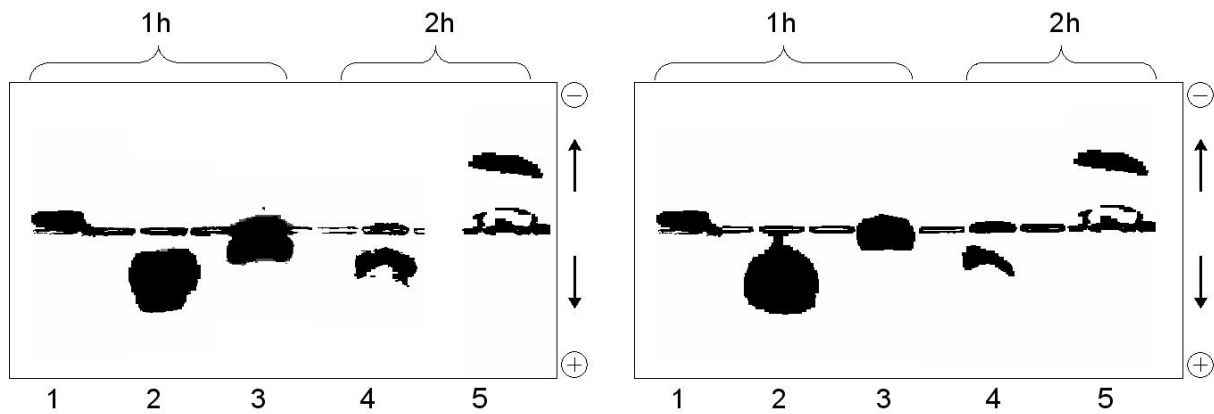


Abbildung 4.39: Nicht-denaturierende Gelelektrophorese der beiden Tweezer **734** (links) und **750** (rechts). 1: ADH (191 μM); 2: Tweezer **734** bzw. **750** (66.4 mM); 3: ADH (95.5 μM)·Tweezer (33.2 mM); 4: ADH (95.5 μM)·Tweezer (33.2 mM); 5: ADH (191 μM). Die beiden nicht-denaturierende Agarose-Gele zeigen, dass das schwach basische Protein (1) in Richtung Kathode wandert, während die beiden entgegengesetzt geladenen Tweezer **734** (links (2)) und **750** (rechts (2)) in Richtung Anode wandern. Nach 1 h Trennzeit hat sich das Enzym an die beiden Tweezer gebunden und deren negativen Ladungen neutralisiert (3). Nach 2 h Trennzeit kommt es hier allerdings nicht zur Dissoziation des Komplexes. Stattdessen wandert der starke Komplex aufgrund einer durch die beiden Tweezer hervorgerufenen negativen Ladungs-Überkompensation in Richtung Anode (4). Das native Protein wandert dagegen nach zweistündiger Trennzeit deutlich in Richtung Kathode (5).

In einem zusätzlichen Experiment sollte überprüft werden, ob sich die Bildung der jeweiligen Protein-Inhibitor-Komplexe durch Zugabe entsprechender Konkurrenz-Moleküle, wie im Fall der Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente, wieder aufheben ließen.

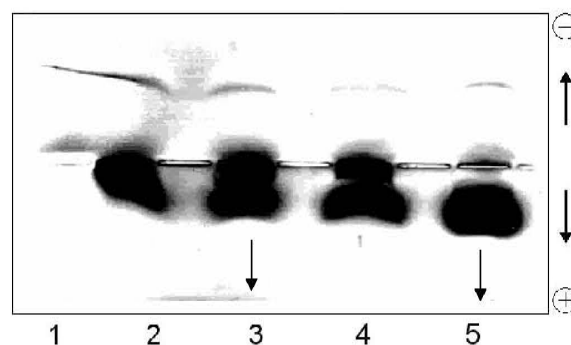


Abbildung 4.40: Nicht-denaturierende Gelelektrophorese des Tweezers **750** und des Clips **622** in Anwesenheit der Gast-Moleküle Ac-Lys-OMe und NAD^+ . 1: ADH (191 μM); 2: ADH (96 μM) Tweezer **750** (34 mM); 3: ADH (64 μM) Tweezer **750** (23 mM)·Ac-Lys-OMe (56 mM); 4: ADH (96 μM)·Clip **622** (34 mM); 5: ADH (64 μM)·Clip **622** (23 mM)· NAD^+ (47 mM). Durch Zugabe der entsprechenden Gastmoleküle sollte der Protein-Inhibitor-Komplex dissoziieren. Die resultierenden Banden für die freien Inhibitoren und das freie Enzym (Spalten 3 und 5) lassen sich allerdings nur schwach erahnen. Die Trennzeit betrug hier 1 h.

Dazu wurde die nicht-denaturierende Gelelektrophorese unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Den Wells der Protein-Inhibitor-Komplexe wurden dabei zusätzlich noch die Konkurrenz-Moleküle Ac-Lys-OMe bzw. NAD^+ hinzu gegeben. Wie man der Abbildung 4.40 entnehmen kann, lassen sich allerdings die Banden der aus der Komplexdissoziation resultierenden freien Inhibitoren und freiem Enzym nur schwach erahnen.

Nachdem nun mittels nicht-denaturierender Gelelektrophorese die Protein-Inhibitor-Komplexe sichtbar gemacht werden konnten, sollten abschließend noch die bei den einzelnen Komplex-Bildungen freiwerdenden exothermen Bindungsenergien mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt werden. Ein bedeutender Vorteil dieser Messtechnik besteht darin, dass sich mit dieser Methode neben der Assoziationsenthalpie ΔH auch noch gleichzeitig der Stöchiometriefaktor n und die Assoziationsentropie ΔS bestimmen lassen.

4.2.2.8 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Zuerst sollte die Assoziationsenthalpie ΔH des Protein-Tweezer **750**-Komplexes bestimmt werden. Aufgrund seiner hohen Stabilität, die sich mittels Gelelektrophorese sogar visualisieren ließ, war hier mit einer besonders hohen exothermen Bindungsenergie zu rechnen. Anstelle eines sigmoidalen Kurvenverlaufs, wurde hier allerdings nur ein Streufeld von Punkten erhalten, das keine Auswertung zuließ. Auch durch eine mehrfache Wiederholung dieses Experiments konnte kein schlüssiges Ergebnis erzielt werden. Gleiches wurde auch für den Clip **622** beobachtet. Eine mögliche Erklärung für das Scheitern dieser Versuche könnte die bei den einzelnen Durchführungen aufgetretene Trübung sein. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um die ausgefallenen Protein-Inhibitor-Komplexe. Eine ITC-Bestimmung war daher aufgrund der starken Komplexbildung nicht möglich.

4.3 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD)

4.3.1 Charakterisierung der G6PD

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) gehört genauso wie die Alkohol-Dehydrogenase (ADH) zur Enzymfamilie der Oxidoreduktasen.^[12, 13] Wie in der Abbildung 4.41 dargestellt ist, katalysiert G6PD die Dehydrierung von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono- δ -Lacton, einem intramolekularen zyklischen Ester, unter gleichzeitiger Reduktion von NADP^+ zu NADPH .^[120-122]

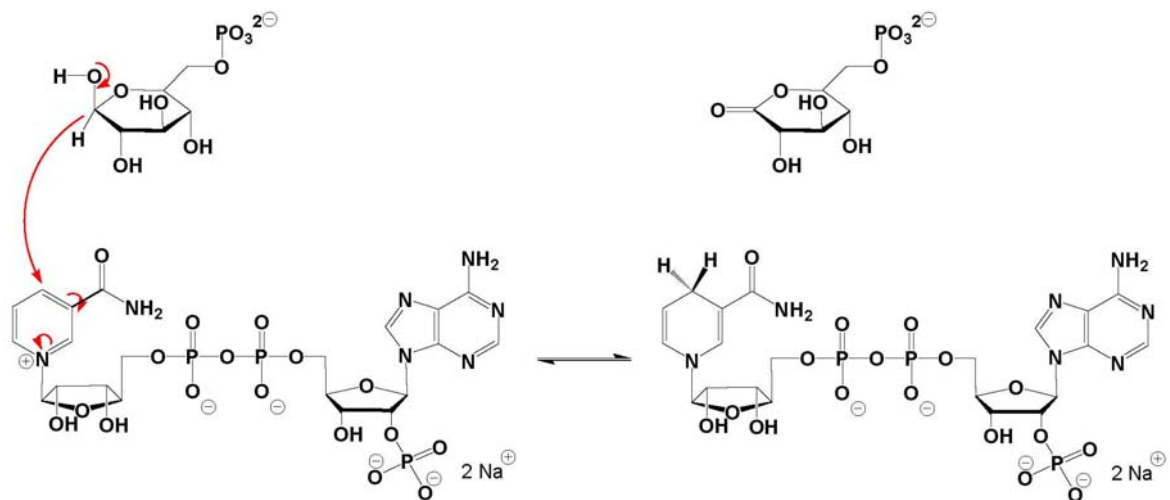


Abbildung 4.41: G6PD katalysiert die Oxidation von Glucose-6-phosphat nach 6-Phosphoglucono- δ -lacton unter gleichzeitiger Reduktion von NADP^+ zu NADPH .

Diese chemische Umwandlung entspricht dem ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt des Pentosephosphat-Weges, oft auch als Phosphogluconat-Weg bekannt.^[13] Daher wird die G6PD oft auch als „Schrittmacherenzym“ des Pentosephosphat-Weges bezeichnet. Der Pentosephosphat-Weg umfasst zwei Funktionen. Die erste Funktion des Pentosephosphat-Weges beinhaltet die Produktion von Pentosen, insbesondere D-Ribose. Diese ist vor allem für die Nucleinsäure-Biosynthese essentiell, die in wachsendem und sich regenerierendem Gewebe sowie in Tumoren mit rascher Geschwindigkeit verläuft. Die zweite wichtige Funktion des Pentosephosphat-Weges besteht in der Produktion von NADPH , das in anabolen Stoffwechselwegen nahezu ubiquitär als Reduktionsmittel verwendet wird. Dessen reduzierende Wirkung spielt vor allem in solchen Geweben eine entscheidende Rolle, die aktiv an der Fettsäure- und Steroidsynthese beteiligt sind. Dazu zählen z. B. die Milchdrüse, Nebennierenrinde, Leber und das Fettgewebe. Diese Gewebearten benötigen NADPH zur

Reduktion von Doppelbindungen und Carbonylgruppen der entstehenden Zwischenprodukte. In Geweben, die kaum Fettsäuren synthetisieren, fehlt der Pentosephosphat-Weg dagegen nahezu vollständig. Dies betrifft z. B. die Skelettmuskulatur und das Herz. Ferner dient die reduktive Wirkung von NADPH dem Schutz der Zellen vor oxidativem Stress. Der Mechanismus dieses Oxidationsschutzes ist in der Abbildung 4.42 dargestellt. Das Enzym Glutathionreduktase verwendet NADPH als Cofaktor und wandelt das oxidierte Tripeptid Glutathion (GSSG), das aus zwei über eine Disulfidbrücke verknüpften Glutathionmolekülen (Glycin, Glutamat und Cystein) besteht, zum reduzierten Glutathion (GSH) unter gleichzeitiger Oxidation von NADPH zu NADP^+ um. Die reduzierte Form von Glutathion (GSH) ist in fast allen Zellen des Menschen vertreten und weist eine antioxidative Wirkung gegenüber aggressiven Oxidantien, wie z. B. Sauerstoffradikalen, Hydroxy-Radikalen oder Wasserstoffperoxid auf.^[123] Das bei der Reduktion von GSSG entstandene NADP^+ wird wiederum durch die G6PD zu NADPH reduziert. Durch diese ständige Regenerierung der reduzierten Form von GSH bewahrt G6PD letztendlich die Aufrechterhaltung der antioxidativen Kapazität im Menschen.

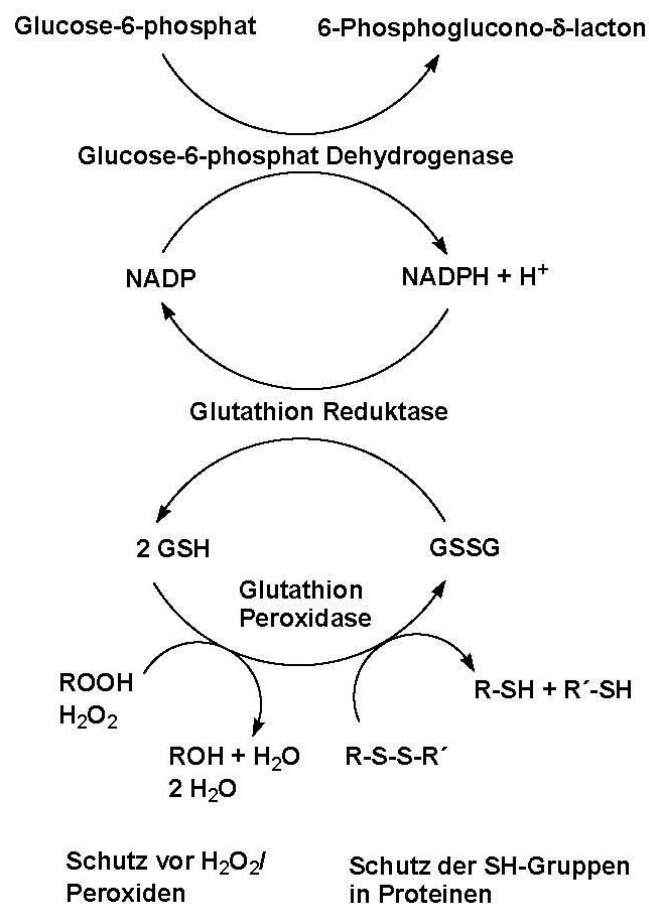
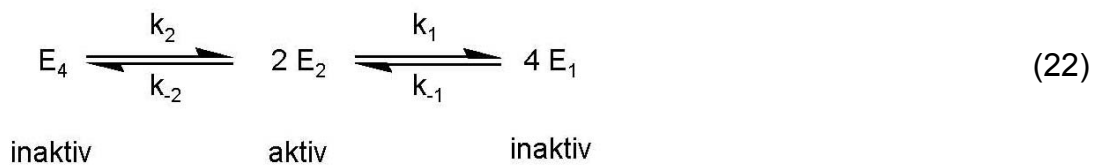


Abbildung 4.42: Mechanismus des Oxidationsschutzes durch NADPH.

Der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel, auch als Favismus bekannt, ist auf einen angeborenen Mangel des Enzyms G6PD durch Mutation des G6PD-Gens zurückzuführen.^[122, 124] Dieser wurde erstmals im Zusammenhang mit dem Genuss von dicken Bohnen (Fava-Bohne, Saubohne) beobachtet. Unter Berücksichtigung aller Varianten und Ausprägungen sind weltweit ca. 400 Millionen Menschen von dieser Mangelerkrankung betroffen. Der Favismus äußert sich durch eine erhöhte Anfälligkeit der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) für oxidative Schädigung. Ein Defekt im G6PD-Gen kann sowohl die Aktivität des Enzyms G6PD als auch dessen Bildung erheblich beeinträchtigen. Es resultiert eine verminderte Umwandlung von NADP^+ zu NADPH, die ernsthafte Konsequenzen im Glutathionstoffwechsel nach sich zieht. Aufgrund des Mangels an NADPH kann Glutathionreduktase die Umwandlung von oxidiertem Glutathion zu reduziertem Glutathion mit antioxidativer Wirkung nicht mehr katalysieren. Die Folge ist eine Verminderung der antioxidativen Schutzwirkung des menschlichen Körpers gegenüber Oxidantien. Von dieser Störung der Glutathionregeneration sind insbesondere die Erythrozyten betroffen.^[125, 126] Diese sind aufgrund ihrer Beteiligung an der Verstoffwechselung von Sauerstoff stets freien Sauerstoffradikalen ausgesetzt, so dass es zu einem verstärkten oxidativen Stress innerhalb der Erythrozyten kommt. Die Schädigung der Erythrozyten durch die freien Sauerstoffradikale kann letztendlich zu einer neonatalen Gelbsucht oder einer hämolytischen Anämie führen. Da sich das G6PD-Gen auf dem Abschnitt q28 des X-Chromosoms beim Menschen befindet, erfolgt dessen Vererbung mit dem X-Chromosom. Aufgrund fehlender Informationen über G6PD auf dem Y-Chromosom, entsteht bei männlichen Nachkommen stets nur eine Gruppe von Erythrozyten mit defektem G6PD-Gen. Bei weiblichen Nachkommen kann dagegen das zweite X-Chromosom über ein gesundes G6PD-Gen verfügen. Folglich sind Männer in der Regel einer schwereren Symptomatik des G6PD-Mangels ausgesetzt als Frauen. Die Symptome können von Beschwerdefreiheit bis hin zu einer lebensbedrohlichen hämolytischen Krise variieren.

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase kommt als Monomer, Dimer und Tetramer vor. Dabei ist nur die dimere Form katalytisch aktiv. Die Dissoziation in Monomere führt wie bei allen Dehydrogenasen zur Inaktivierung der enzymatischen Aktivität.^[127] Jede Untereinheit der G6PD besitzt eine molare Masse von etwa 59 kDa. G6PD existiert in zwei Isoformen. Die kurze Isoform umfasst 249 Aminosäuren und ist vor allem in den Erythrozyten und in der Leber vertreten. Die lange Isoform umfasst dagegen 515 Aminosäuren und ist in Lymphoblasten, Granulozyten und Spermazellen anzutreffen.

In ihrer aktiven Form liegt bei der menschlichen G6PD ein schnelles Gleichgewicht zwischen Dimer und Tetramer vor:



Die Lage des Gleichgewichts wird sowohl durch den pH-Wert als auch durch die Ionenstärke bestimmt. Ein pH-Wert oberhalb von 8 und eine hohe Ionenstärke begünstigen die dimere Form. Ein pH-Wert unterhalb von 6 verschiebt dagegen die Lage des Gleichgewichts auf die Seite des Tetramers. Die Anwesenheit von NADP^+ und NADPH begünstigen ebenfalls die Vereinigung der aktiven Dimere unter Bildung des Tetramers.

Die Röntgenstruktur der menschlichen G6PD, die der Abbildung 4.43 zu entnehmen ist, zeigt, dass sich in jeder Untereinheit zwei NADP^+ -Moleküle befinden, ein katalytisches NADP^+ und ein strukturelles NADP^+ .^[120, 122] Während das katalytische NADP^+ -Molekül als Cofaktor die klassische „Rossmann-Spalte“ besetzt, befindet sich das strukturelle NADP^+ -Molekül zwischen der Dimeren-Schnittstelle und dem C-Terminus, weit entfernt von der katalytischen Cofaktor-Bindungsstelle.

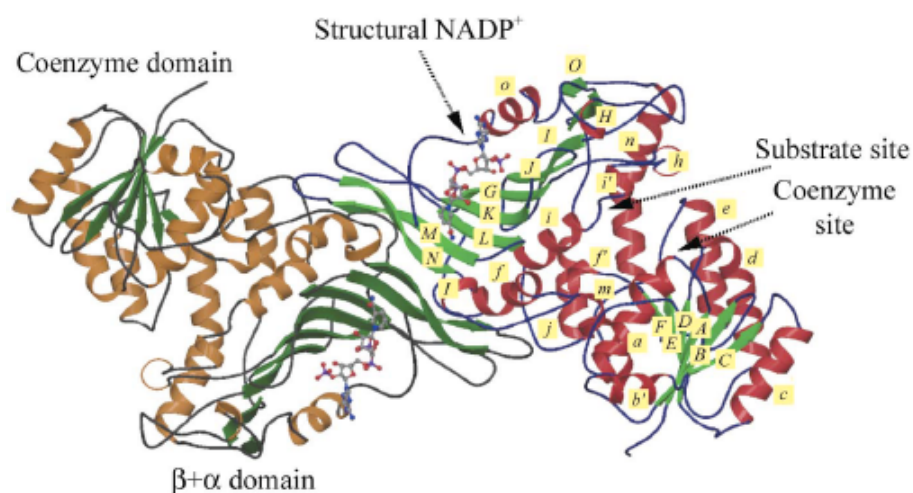


Abbildung 4.43: Röntgenstruktur der menschlichen G6PD in der dimeren Form. In der Untereinheit A sind die Helicas rot und die β -Stränge hellgrün gefärbt; in der Untereinheit B sind die Helicas orange und die β -Stränge dunkelgrün gefärbt. In der Untereinheit A sind alle sekundären Strukturelemente markiert. Das strukturelle NADP^+ -Molekül jeder Untereinheit ist als blaues „Ball-and-Stick Model“ dargestellt.^[120]

Laut Literatur beträgt der K_D -Wert des strukturellen NADP^+ 37 nM und der des katalytischen NADP^+ 7.8 μM . Demnach wird das strukturelle NADP^+ etwa 200mal fester gebunden als das katalytische NADP^+ . Ein Blick in die Röntgenstruktur der menschlichen G6PD bestätigt dies. Wie man in der Abbildung 4.44 erkennen kann, befindet sich das strukturelle NADP^+ im Gegensatz zum katalytischen NADP^+ tief in einer überwiegend positiv geladenen Spalte. Der Nikotinamid Ring ragt dabei vollständig in die Spalte hinein und steht damit für einen Hydridtransfer nicht zur Verfügung. Die Ausbildung zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen der Pyrophosphatgruppe des strukturellen NADP^+ -Moleküls mit den basischen Aminosäuren Arg-487, Arg-357, Lys-238, Lys-366 und Arg-370 sowie π - π -Stapelwechselwirkungen der Adenin- und Nikotinamidringe des NADP^+ -Moleküls zu den aromatischen Aminosäuren Tyr-503, Trp-509 und Tyr-401 tragen zu einer äußerst starken Bindung des strukturellen NADP^+ -Moleküls bei.

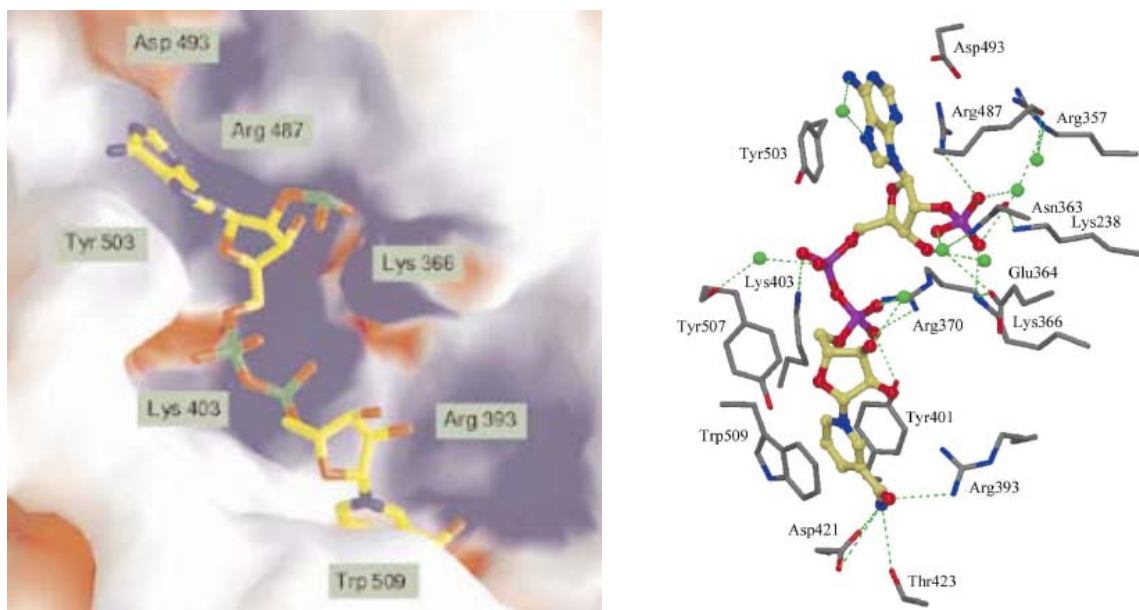


Abbildung 4.44: Ausschnitt der strukturellen NADP^+ -Bindungsstelle aus der Röntgenstruktur der menschlichen G6PD. Links: Potentialoberfläche der strukturellen NADP^+ -Bindungsstelle (die blauen und roten Flächen markieren die positiv und negativ geladenen Regionen). Rechts: Potentielle Wasserstoffbrückenbindungen und π - π -Stapelwechselwirkungen des strukturellen NADP^+ mit den umgebenden Aminosäurenresten.^[122]

Die Funktion dieses fest gebundenen strukturellen NADP^+ -Moleküls war lange Zeit umstritten. Vor kurzem haben allerdings die Arbeitsgruppen Lam und Engel Hinweise dafür liefern können, dass die Hauptaufgabe des strukturellen NADP^+ vermutlich darin besteht, die Langzeit-Stabilität des Enzyms aufrechtzuerhalten.^[122, 128] Ferner könnte das strukturelle

NADP^+ im Fall eines niedrigen NADP^+ -Niveaus als möglicher NADP^+ -Speicher fungieren. Dies setzt allerdings ein dynamisches Gleichgewicht des strukturellen NADP^+ -Moleküls voraus. Es wird angenommen, dass die Bindung des Substrats G6P an die Phosphat-Bindungsstelle am C-Terminus eine Konformationsänderung des Enzyms induziert. Durch diese Konformationsänderung wird die starke Bindung des strukturellen NADP^+ -Moleküls geschwächt und gleichzeitig dessen Migration zur „Active Site“ ermöglicht. Das klinische Interesse an dem strukturellen NADP^+ ist zunehmend gestiegen, als röntgenspektroskopische Untersuchungen ergaben, dass sich viele der Klasse I Mutationen, die auf einen schweren G6PD-Mangel zurückzuführen sind, in unmittelbarer Nähe des strukturellen NADP^+ und der Dimeren-Schnittstelle befinden (Abbildung 4.45). Es wird angenommen, dass diese Mutationen die hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken der einzelnen Dimeren-Schnittstellen stören und dadurch eine verminderte Enzymstabilität induzieren. Diese verminderte Enzymstabilität könnte die Ursache schwerwiegender Krankheitsbilder sein.

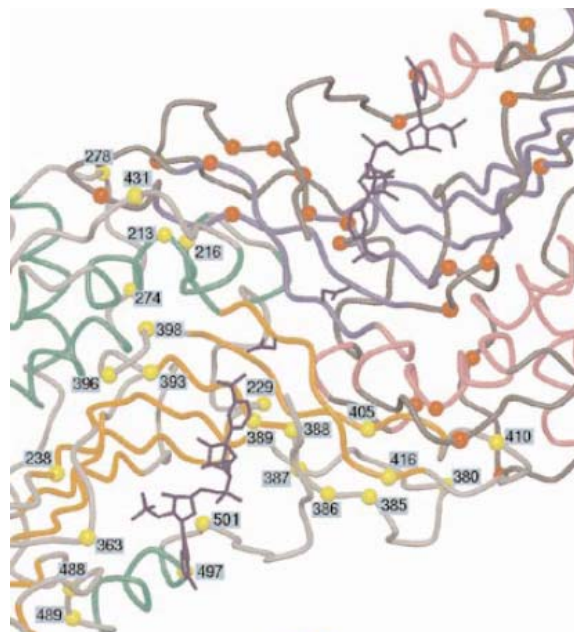


Abbildung 4.45: Klasse I Mutationen in der Nähe des strukturellen NADP^+ und der Dimeren-Schnittstelle. Die roten und gelben Punkte markieren die Mutationen in den Untereinheiten A und B. Das strukturelle NADP^+ -Molekül jeder Untereinheit ist als blaues „Ball-and-Stick Model“ dargestellt.^[122]

Die Existenz des strukturellen NADP^+ ist allerdings nur auf höhere Organismen beschränkt. Das bakterielle Enzym *Leuconostoc mesenteroides* weist z. B. keine derartige Bindungsstelle für strukturelles NADP^+ auf. Im Gegensatz zur menschlichen G6PD ist ihre Oberfläche überwiegend negativ geladen, so dass jegliche NADP^+ -Moleküle abgestoßen werden würden.

Des Weiteren kann das bakterielle Enzym keine tetramere Form ausbilden, so dass sich das bei der menschlichen G6PD beobachtete Dimer-Tetramer-Gleichgewicht nicht einstellen kann. Dies ist auf das Fehlen entsprechender Salzbrücken an der Dimeren-Schnittstelle zurückzuführen, die für die Ausbildung des Tetramers verantwortlich sind.

Die folgenden enzymkinetischen Experimente wurden mit der G6PD von *Saccharomyces cerevisiae* (Bakers' Yeast) durchgeführt. Diese zeigt eine hohe Überstimmung ihrer Aminosäuresequenz mit der der menschlichen G6PD.^[129] Allerdings verfügt die Bakers' Yeast G6PD genauso wie die des bakteriellen Enzyms *Leuconostoc mesenteroides* über keine Bindungsstelle für strukturelles NADP⁺. Das strukturelle NADP⁺ sollte bei den Untersuchungen sowieso keine Rolle spielen dürfen, da es aufgrund seiner starken Bindung an das Enzym von den Rezeptormolekülen nicht beeinflusst werden kann.

Inhibitoren der G6PD

Aufgrund ihrer Beteiligung an verschiedenen essentiellen Zellfunktionen, die Zellwachstum, Zellrettung und Kontrolle unterschiedlicher Redoxreaktionen einschließen, stellt die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ein attraktives Zielenzym für potentielle Inhibitoren dar. Eine effektive Hemmung der G6PD könnte bei der Behandlung unterschiedlicher Krankheitsbilder wie z. B. Diabetes und Fettleibigkeit von Nutzen sein. Die meisten heute bekannten G6PD-Inhibitoren enthalten Zuckerphosphate oder verschiedene Nukleotide, die um die Substrat- bzw. Cofaktor-Bindungsstellen konkurrieren. Zu den bekanntesten G6PD-Inhibitoren zählt allerdings die körpereigene Steroidverbindung Dehydroepiandrosteron (DHEA), die einen K_i-Wert von 9 µM aufweist.^[130] Dessen Struktur ist in Abbildung 4.46 dargestellt. Das Hormon DHEA wird in der Nebennierenrinde produziert und anschließend im Körper in die Sexualhormone Testosteron und Östrogen transferiert. DHEA ist das weitverbreitetste Hormon im Blut und liegt im Gehirn in noch höheren Konzentrationen vor. Ihm werden unter anderem antioxidative und antikanzerogene Eigenschaften zugesprochen. Seine inhibitorische Effizienz liegt sehr wahrscheinlich darin begründet, dass DHEA als unkompetitiver G6PD-Inhibitor an den ternären Enzym-Cofaktor-Substrat-Komplex bindet. Dieser Hemm-Mechanismus kommt äußerst selten vor.^[131, 132] Dabei verhält sich DHEA sowohl gegenüber dem Cofaktor NADP⁺ als auch gegenüber dem Substrat G6P unkompetitiv.

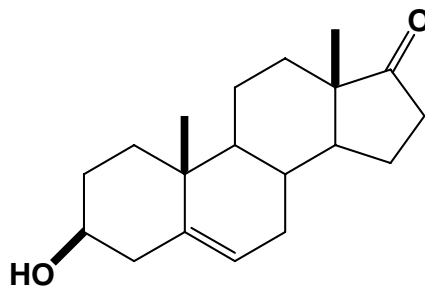


Abbildung 4.46: Strukturformel der Steroidverbindung Dehydroepiandrosteron (DHEA).

Vor kurzem wurde in der Arbeitsgruppe Lee *et al.* eine neue Klasse potentieller G6PD-Inhibitoren entdeckt.^[133] Vergällte Catechine zeigen eine kompetitive Kinetik gegenüber dem Cofaktor NADP^+ und eine unkompetitive gegenüber dem Substrat G6P. Ihre IC_{50} -Werte liegen mit 0.18 - 0.25 μM deutlich niedriger als die des Steroids DHEA. Allerdings erweisen sich die vergällten Catechin-Inhibitoren in Zell-Assays als recht unselektiv. In Gegenwart anderer Proteine wie z. B. Isocitrat Dehydrogenase (IDH) und Fettsäure Synthase (FAS) wurden höhere IC_{50} -Werte erzielt, was auf eine Wechselwirkung der Inhibitoren mit den einzelnen Proteinen zurückzuführen ist. In der Abbildung 4.47 sind neben der Strukturformel des vergällten Catechins (-)-Epigallocatechingallat (EGCG) auch die der anderen beiden bekannten G6PD-Inhibitoren Isofluran, und Sevofluran dargestellt.^[134-136]

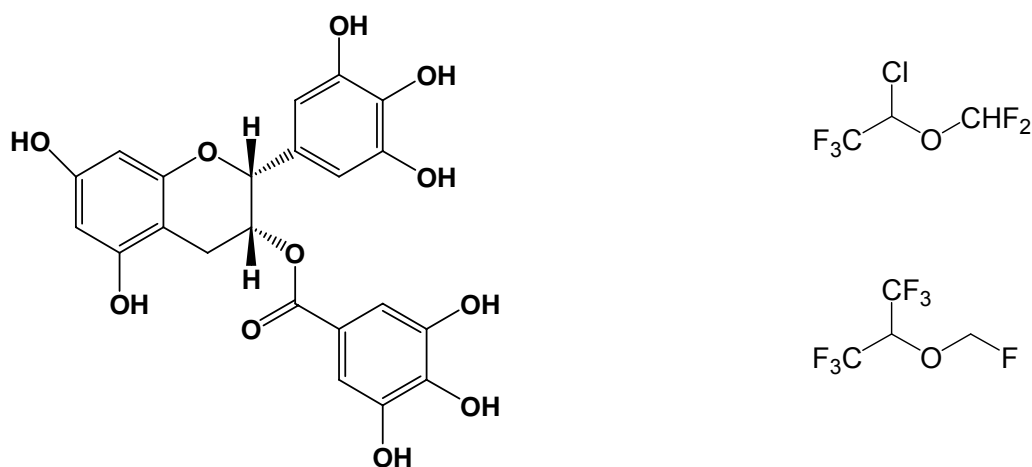


Abbildung 4.47: Links: Strukturformel des vergällten Catechins (-)-Epigallocatechingallat (EGCG). Rechts: Strukturformeln von Isofluran (oben) und Sevofluran (unten).

4.3.2 Enzymkinetische Untersuchungen der G6PD^[137]

Nachdem anhand der Alkohol-Dehydrogenase eindeutig demonstriert werden konnte, dass sich mit Hilfe dieser künstlichen wasserlöslichen Rezeptormoleküle enzymatische Reaktionen gezielt beeinflussen lassen, sollte deren inhibitorische Effizienz als nächstes an einer weiteren Dehydrogenase getestet werden.^[108] Bei der Wahl der Dehydrogenase wurde vor allem darauf geachtet, dass diese im Vergleich zur ADH ein aus therapeutischer Sicht attraktiveres Zielprotein darstellt. Ein weiteres Kriterium, das diese Dehydrogenase unbedingt erfüllen sollte bestand darin, dass der Cofaktor wiederum nur schwach von der „Rossmann-Spalte“ gebunden wird. Andernfalls wäre die Möglichkeit, dass die Inhibitoren mit der Enzym-Bindungsstelle um den Cofaktor effektiv konkurrieren können, nicht gegeben. Die G6PD erfüllte diese beiden Anforderungen. Mittels Fluoreszenztitration konnte in diesem Projekt nachgewiesen werden, dass ihr Cofaktor NADP^+ nur schwach in der „Rossmann-Spalte“ mit einem K_D -Wert von 90 μM gebunden wird. Der Literatur K_D -Wert beträgt 45 μM . Das Substrat G6P wird ähnlich stark gebunden. Sein Literatur K_D -Wert beträgt etwa 50 μM .^[138] Damit ist die Grundvoraussetzung einer Konkurrenz zwischen den Inhibitoren und der „Rossmann-Spalte“ um den Cofaktor gegeben. Ihre aus therapeutischer Sicht gesehene Attraktivität als Zielprotein verdankt die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ihrer Funktion als „Schrittmacherenzym“ des Pentosephosphatweges. Zu den beiden wichtigsten Funktionen des Pentosephosphatweges zählen die Produktion von NADPH für reduktive Prozesse und die Bereitstellung von Ribosephosphaten für die Nukleotidsynthese (RNA, DNA, ATP). Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle beim Zellwachstum, könnte im Fall einer eventuellen Inhibition der G6PD durch die Rezeptormoleküle die Proliferationsrate vieler Zelltypen deutlich herabgesetzt werden. Dies wäre insbesondere zur Bekämpfung von Krebszellen von entscheidendem Interesse. Die Untersuchungen der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase mit den entsprechenden Rezeptormolekülen erfolgte im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen den Arbeitsgruppen T. Schrader und F.-G. Klärner von der Universität Duisburg-Essen und M. Kirsch und H. de Groot vom Universitätsklinikum Essen. Die dazu erforderlichen kinetischen Studien wurden alle von M. Kirsch durchgeführt. ^1H -NMR-Titrationen, Fluoreszenztitrationen, Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)-Messungen, sowie Molecular Modelling wurden in Kooperation mit J. Polkowska, F. Bastkowski, K. Kowski und T. Schaller durchgeführt.

Zuerst wurden die IC_{50} -Werte bestimmt. Anhand dieser sollte sich schnell zeigen, ob die Rezeptormoleküle überhaupt als potentielle G6PD-Inhibitoren in Frage kommen. Die Untersuchungen beschränkten sich dabei zunächst nur auf die beiden Clips **606** und **622**.

4.3.2.1 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Analog zur Alkohol-Dehydrogenase erfolgte auch hier die quantitative Bestimmung der enzymatischen Aktivität durch photometrische Verfolgung der Konzentrationsänderung des Cofaktors $NADP^+$. Wie bereits zuvor im Fall des Redoxpaares $NAD^+/NADH$ weist auch hier die reduzierte Form NADPH im Gegensatz zur oxidierten Form $NADP^+$ ein UV/Vis-charakteristisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm auf. Die Umsatzbestimmung lässt sich daher leicht über die anfängliche lineare Extinktionszunahme des gebildeten NADPH verfolgen. Um einen streng linearen Absorptionsanstieg gewährleisten zu können, wurde die Reaktionsdauer auf 300 s beschränkt. Alle kinetischen Untersuchungen wurden unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Als Puffer diente ein Kalium-Phosphatpuffer (50 mM) mit einem pH-Wert von 7.6. Die Temperatur wurde während der gesamten Messzeit bei 37 °C konstant gehalten. Des Weiteren wurden 1.4 mM $MgCl_2$ hinzugefügt. Die Endkonzentrationen im Assay betrugen 0.3 nM für das Enzym G6PD, 2 mM für das Substrat G6P und 200 μ M für den Cofaktor $NADP^+$. Die Clip-Konzentrationen wurden dagegen variiert. Der große Überschuss an Cofaktor und Substrat gegenüber dem Enzym waren für eine optimale Durchführung des klassischen G6PD-Assays essentiell.^[106] Alle kinetischen Experimente wurden durch die Zugabe des Enzyms als letzte Komponente gestartet.

Unter der Annahme, dass die beiden Clips **606** und **622** die Inhibition der G6PD analog zur ADH durch Komplexierung des Cofaktors induzieren, sollten sich für beide Inhibitoren IC_{50} -Werte in der Größenordnung der eingesetzten $NADP^+$ -Konzentration ergeben. In diesem Fall würden die beiden Clips wieder jeweils den Cofaktor $NADP^+$ aus der „Rossmann-Spalte“ herausziehen und in ihrer Kavität komplexieren. Dadurch würde das zur enzymatischen Umsetzung essentielle $NADP^+$ -Niveau so stark dezimiert werden, bis schließlich keine enzymatische Substratoxidation durch die G6PD mehr möglich wäre. Der für Clip **606** ermittelte IC_{50} -Wert von 350 μ M, der etwa 1.8 Äquivalente des Cofaktors $NADP^+$ entspricht,

bestätigte einen derartigen kompetitiven Cofaktor-Abfang-Hemm-Mechanismus, der bereits zuvor im Fall der Alkohol-Dehydrogenase beobachtet werden konnte.

Für Clip **622** ergab sich dagegen überraschenderweise ein weit im substöchiometrischen Bereich liegender IC_{50} -Wert von 7 μM . Dieser entspricht etwa nur 0.03 Äquivalenten des Cofaktors $NADP^+$. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte beider Clips ist in der Abbildung 4.48 dargestellt.

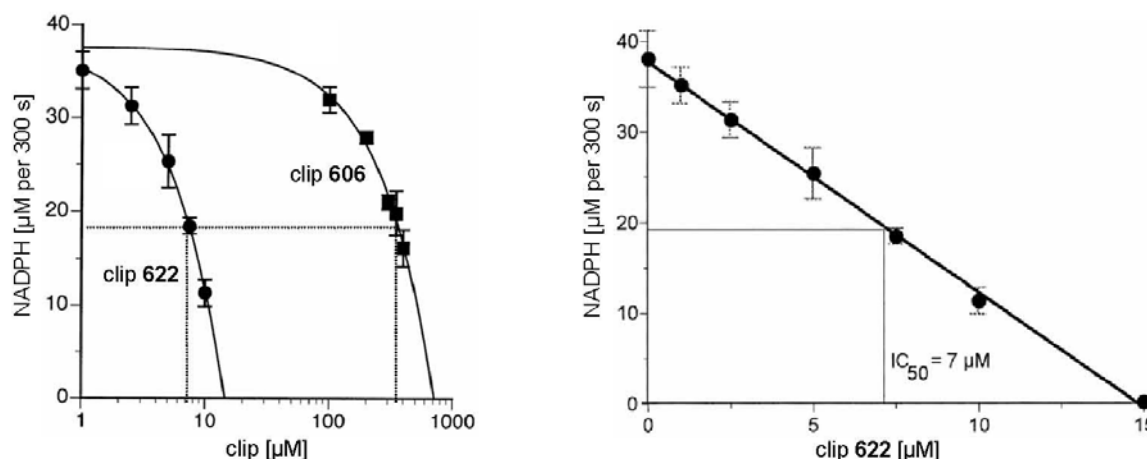


Abbildung 4.48: Links: Logarithmische Auftragung der NADPH-Konzentration gegen die Inhibitorkonzentration zur Bestimmung der IC_{50} -Werte beider Clips **606** und **622**. Rechts: Lineare Auftragung der NADPH-Konzentration gegen die Inhibitorkonzentration zur Ermittlung des IC_{50} -Wertes von Clip **622**.

Diese außergewöhnlich hohe inhibitorische Effizienz des Clips **622** im Vergleich zu Clip **606** kann nicht mehr allein auf die Komplexbildung des Cofaktors zurückgeführt werden. Dagegen sprechen auch die in der Tabelle 4.4 aufgeführten ähnlichen Dissoziationskonstanten beider Clips. Daher müssen die beiden Clips im Gegensatz zur ADH hier unterschiedlichen Hemm-Mechanismen folgen. Der Vergleich beider Clips miteinander ergibt einen einzigen schnell ersichtlichen peripheren Unterschied. Während Clip **606** einen Phosphonat-Substituenten an der zentralen Benzol-„Spacereinheit“ trägt, ist dies im Fall des Clips **622** ein Phosphat-Substituent. Ein negativ geladenes Phosphor-Sauerstoff-Atom wird also gegen eine ungeladene, voluminösere Methylgruppe ausgetauscht. Ob sich mit dieser zusätzlichen negativen Ladung des Clips **622** dessen ungewöhnlich hohe inhibitorische Effizienz erklären lässt, sollte als nächstes untersucht werden.

	¹ H-NMR-Titration K _D [μM]	Fluoreszenztitration K _D [μM]
Clip 606 + NADP ⁺	910	197
Clip 622 + NADP ⁺	303	222

Tabelle 4.4: Übersicht der mittels ¹H-NMR- und Fluoreszenztitrationen ermittelten Dissoziationskonstanten K_D beider Clips **606** und **622** mit dem Cofaktor NADP⁺.

Dazu wurden die beiden Modellverbindungen Spacer **406** und **422** ebenfalls auf ihre IC₅₀-Werte hin überprüft. Unter der Annahme, dass die inhibitorische Wirkung beider Rezeptormoleküle ausschließlich auf supramolekularen Eigenschaften beruht, die gleichzeitig die Existenz einer Kavität voraussetzen, sollte im Fall der beiden Spacer-Moleküle, die über keinerlei Seitenwände verfügen, kein inhibitorischer Effekt bzgl. der enzymatischen Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu beobachten sein. Dies traf jedoch nicht zu. Die enzymatische Reaktion der G6PD wurde durch beide Modellverbindungen beeinflusst. Allerdings erweist sich auch hier der Bis-Phosphat-Spacer **422** mit einem substöchiometrischen IC₅₀-Wert von 53 μM hinsichtlich des Cofaktors NADP⁺ als ein deutlich effektiverer Inhibitor gegenüber dem Bis-Phosphonat-Spacer **406** mit einem IC₅₀-Wert weit oberhalb von 500 μM. Diese 10- bis 60-fach höhere inhibitorische Effektivität der Phosphat-Inhibitoren **622** und **422** gegenüber den Phosphonat-Inhibitoren **606** und **406** deutet auf einen entscheidenden elektrostatischen Beitrag der Phosphat-Substituenten zur Enzyminhibition hin. Die G6PD muss also über mindestens eine sterisch klar definierte Enzym-Bindungsstelle verfügen, die bevorzugt von Phosphat-Anionen besetzt wird. Als mögliche Angriffspunkte für den Inhibitor **622** kommen dazu sowohl die Substrat- als auch die Cofaktorbindungsstelle in Frage, da beide, G6P und NADP⁺, genauso wie Clip **622**, Phosphat-Anionen tragen. Einen ersten eindeutigen Hinweis auf die hohe Affinität des Clips **622** an das Enzym G6PD konnte mit Hilfe eines einfachen Ultrafiltrationsexperiments gewonnen werden.^[139] Neben der Tatsache, dass die Phosphat-Substituenten im Vergleich zu den entsprechenden Phosphonat-Substituenten über eine zusätzliche negative Ladung verfügen, die elektrostatische Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche begünstigen, könnte deren höhere inhibitorische Effizienz zudem auch auf einen sterischen Effekt zurückgeführt werden. So könnten die Phosphonat-Methylgruppen aufgrund ihrer Größe die Bindung an die „Active Site“ erschweren. Eine sterische Hinderung durch die kleineren negativ geladenen Phosphat-Sauerstoff-Atome kann dagegen ausgeschlossen werden.

4.3.2.2 Ultrafiltrationsexperiment

Für das Ultrafiltrationsexperiment wurde eine 10 μM -Stammlösung des Clips **622** in Kalium-Phosphatpuffer vorbereitet. Dieses Experiment wurde einmal in Abwesenheit und einmal in Anwesenheit des Enzyms G6PD durchgeführt. Im letzteren Fall betrug die Enzymkonzentration 2.5 μM . Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden beide Lösungen nacheinander über ein Centricon (Cut-Off Filter) filtriert, dessen Filterporen nur für Verbindungen bis zu einer Größe von 30 kDa permeabel waren. Anschließend wurden beide Filtrate jeweils fluoreszenzspektroskopisch bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm untersucht. Wie man der Abbildung 4.49 entnehmen kann, lässt sich in Abwesenheit des Enzyms die charakteristische Fluoreszenzbande des Clips **622** bei 340 nm im Filtrat der Clip-Lösung eindeutig detektieren. In Anwesenheit des Enzyms G6PD fehlt diese dagegen im Filtrat der Clip-Lösung vollständig. Dies spricht für die Bildung eines stabilen binären Enzym-Clip **622**-Komplexes, der aufgrund seiner Größe, die ein Vielfaches von 30 kDa beträgt, die Filterporen des Centricons nicht passieren kann.

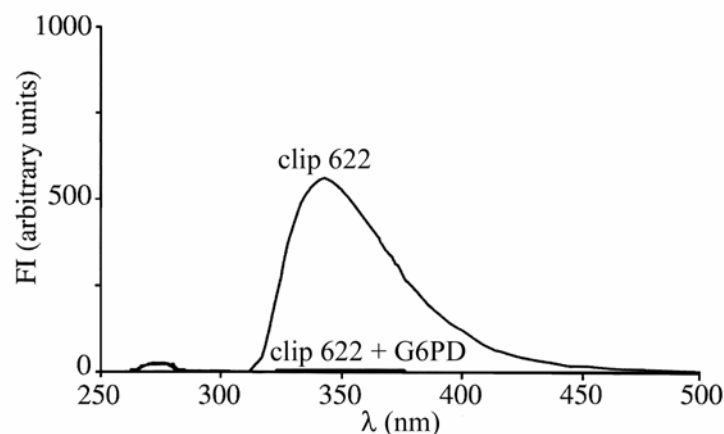


Abbildung 4.49: Ultrafiltrationsexperiment des Clips **622** in Abwesenheit und in Anwesenheit des Enzyms G6PD.

Als nächstes wurden mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Plots die Hemm-Mechanismen beider Clips **606** und **622** aufgeklärt

4.3.2.3 Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots bei variabler Cofaktorkonzentration

Wie bereits zuvor erwähnt wurde, lässt sich die Kinetik der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase analog zur Alkohol-Dehydrogenase mit Hilfe des Bireaktanten-Modells beschreiben. Im Gegensatz zur ADH liegt hier allerdings kein „Steady-State, Sequential Ordered Model“, sondern ein „Rapid-Equilibrium, Sequential Random Model“ vor.^[84] Dies konnte mit Hilfe des NADP^+ -Analog-Inhibitors $S\text{-NADP}^+$ eindeutig nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots mussten allerdings auch hier, wie bereits zuvor im Fall der ADH, beide Möglichkeiten der variablen Substrat- bzw. Cofaktorkonzentrationen berücksichtigt werden. Die Inhibitorkonzentrationen blieben dabei stets konstant. Entsprechend einer Dehydrogenase, die nach dem „Rapid-Equilibrium, Sequential Random Model“ arbeitet, ergibt sich für den Analog-Inhibitor $S\text{-NADP}^+$ eine nichtkompetitive Hemmung bzgl. variabler Substratkonzentration und eine kompetitive Hemmung bzgl. variabler Cofaktorkonzentration. Demnach existiert im Fall der G6PD im Gegensatz zur ADH keine bevorzugte Reihenfolge der Substrat- und Cofaktor-Bindung an die „Active Site“. Das Schema des „Rapid-Equilibrium, Sequential Random Models“ ist in der Abbildung 4.50 dargestellt.

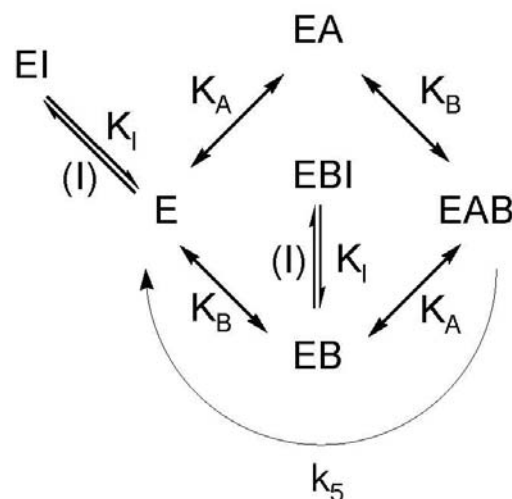


Abbildung 4.50: „Rapid-Equilibrium, Sequential Random Model“.

Wie man der Abbildung 4.51 entnehmen kann, bestätigen die Lineweaver-Burk-Plots den für Clip **606** zuvor postulierten kompetitiven NADP^+ -Entzugs-Mechanismus. Demnach konkurriert Clip **606** effektiv mit der „Rossmann-Spalte“ um den Cofaktor NADP^+ .

Für Clip **622** ergeben dagegen die Lineweaver-Burk-Plots bei variabler Cofaktorkonzentration einen ungewöhnlichen Schnittpunkt im ersten x,y-Quadranten. Dieser Schnittpunkt konnte zunächst keinem der klassischen Hemm-Mechanismen zugeordnet werden. Damit war eine Charakterisierung dieses Hemm-Mechanismus allein mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Plots nicht mehr möglich. Die Lineweaver-Burk-Plots zeigen an dieser Stelle eindeutig ihre Grenzen auf. Anhand eines Literaturbeispiels konnte dieser ungewöhnliche Schnittpunkt allerdings später dem so genannten partiell unkompetitiven Hemm-Mechanismus zugeordnet werden.^[89, 140]

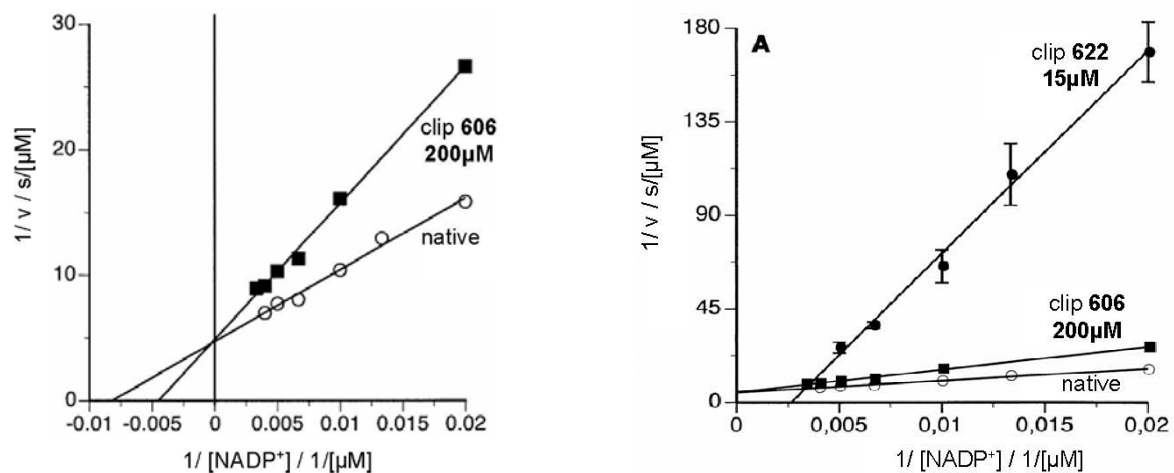


Abbildung 4.51: Lineweaver-Burk-Plots der beiden Clips **606** und **622** bei variabler Cofaktorkonzentration. Links: Lineweaver-Burk-Plot des Clips **606**. Rechts: Lineweaver-Burk-Plots beider Clips **606** und **622**.

Unter Berücksichtigung der kinetischen Grundlagen des Kapitels 3.3.3 wurde dieser ungewöhnliche Schnittpunkt im positiven x,y-Quadranten auf eine partielle Hemmung hin untersucht. Dazu erfolgte entsprechend Whiteley eine zweite Auftragung der partiellen Geschwindigkeit $[v/V_0 - v]$ gegen die reziproke InhibitorKonzentration ($1/[I]$) bei unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen. Wie man der Abbildung 4.52 entnehmen kann, schneiden sich die native Gerade und die Inhibitor-Geraden in einem Schnittpunkt vom Ursprung entfernt auf der Abzisse. Dies spricht eindeutig für eine partielle Hemmung. Allerdings befindet sich dieser Schnittpunkt im Gegensatz zu den klassischen Lehrbuchbeispielen nicht im negativen, sondern im positiven Abzissen-Bereich. Ein weiterer Unterschied zu den bereits bekannten partiellen Hemm-Mechanismen besteht darin, dass hier im Gegensatz zu der klassischen partiell unkompetitiven Hemmung die Steigung der Geraden mit zunehmender Substratkonzentration zu und nicht abnimmt. Damit stellt dieser

Schnittpunkt einen neuen Befund für die Enzymologen dar, den es noch genauer zu untersuchen galt.

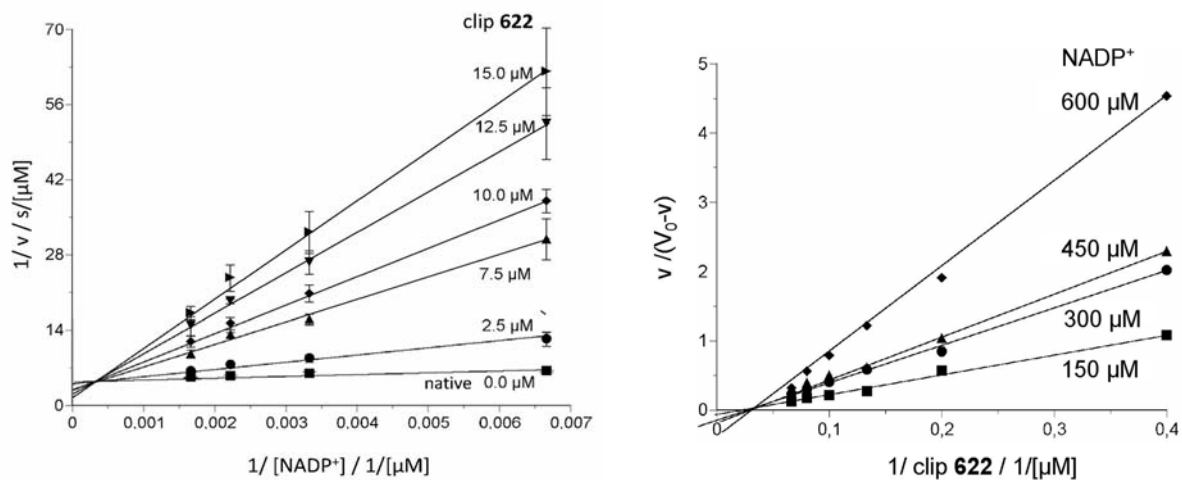


Abbildung 4.52: Links: Lineweaver-Burk-Plots des Clips **622** nach herkömmlicher Weise. Recht: zweite Auftragung der partiellen Geschwindigkeit $[v/V_0-v]$ gegen die reziproke InhibitorKonzentration ($1/[I]$) bei unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen nach Whiteley.

Basierend auf diesen bisher erworbenen experimentellen Erkenntnissen wird für Clip **622** ein ternärer Komplex postuliert. Es wird angenommen, dass Clip **622** an den Enzym-Cofaktor-Komplex bindet und gleichzeitig den Cofaktor $NADP^+$ in seiner Kavität komplexiert. Durch die zusätzliche Komplexierung des Cofaktors wird der zunächst schwache binäre Enzym-Inhibitor-Komplex deutlich stabilisiert. Der resultierende ternäre Komplex fungiert als wesentlich stärkerer Inhibitor. In diesem ungewöhnlichen ternären Komplex übernimmt Clip **622** damit zwei Funktionen. Zum einen verhält sich Clip **622** als Gast gegenüber dem Enzym G6PD und gleichzeitig fungiert er als Wirt gegenüber dem Cofaktor $NADP^+$. Demnach sind auch hier die Seitenwände des Inhibitors für eine effektive Inhibition der enzymatischen Umsetzung von G6P durch die Oxidoreduktase G6PD unerlässlich. Dies spiegelt sich insbesondere in dem großen Sprung der beiden IC_{50} -Werte von Clip **622** und Spacer **422** wider. Während Clip **622** einen IC_{50} -Wert von 7 μM aufweist, beträgt der des Spacers **422** lediglich 53 μM . Diese etwa siebenmal effektivere Hemmung durch den Clip **622** ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass die Kavität für eine effektive Inhibition essentiell ist. In einem zusätzlichen Experiment konnte nachgewiesen werden, dass sich der postulierte ternäre Komplex stets in einem dynamischen Gleichgewicht mit dem freien Enzym befindet. So lässt sich die enzymatische Aktivität nach vorausgegangener vollständiger Inhibition durch den Clip **622** durch Zugabe weiterer fünf Äquivalente Cofaktor $NADP^+$ bis zu 100% wieder reaktivieren.

4.3.2.4 Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente der G6PD in Abhängigkeit der beiden bestimmenden Komponenten Clip 622 und Cofaktor NADP⁺

Dazu wurde zunächst der klassische G6PD-Assay in Kalium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.6, 37 °C) vorbereitet. Die Endkonzentrationen betrugen 2 mM G6P, 200 μ M NADP⁺ und 0.3 nM G6PD. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms G6PD gestartet. Nach 600 s wurde diese durch Zugabe unterschiedlicher Clip **622** Konzentrationen (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M und 50 μ M) unterbunden. Wie man der Abbildung 4.53 entnehmen kann, war die Enzymhemmung je nach Inhibitorkonzentration unterschiedlich effektiv. Eine vollständige Inhibition der G6PD konnte ab einer Konzentration von 15 μ M an Clip **622** erzielt werden. Nach weiteren 600 s Inkubationszeit des Clips **622** wurden dem Assay zusätzlich fünf Äquivalente Cofaktor NADP⁺ (1 mM) hinzugefügt. Dadurch konnte die enzymatische Reaktion nach vorausgegangener vollständiger Inhibition bis zu 100 % reaktiviert werden.

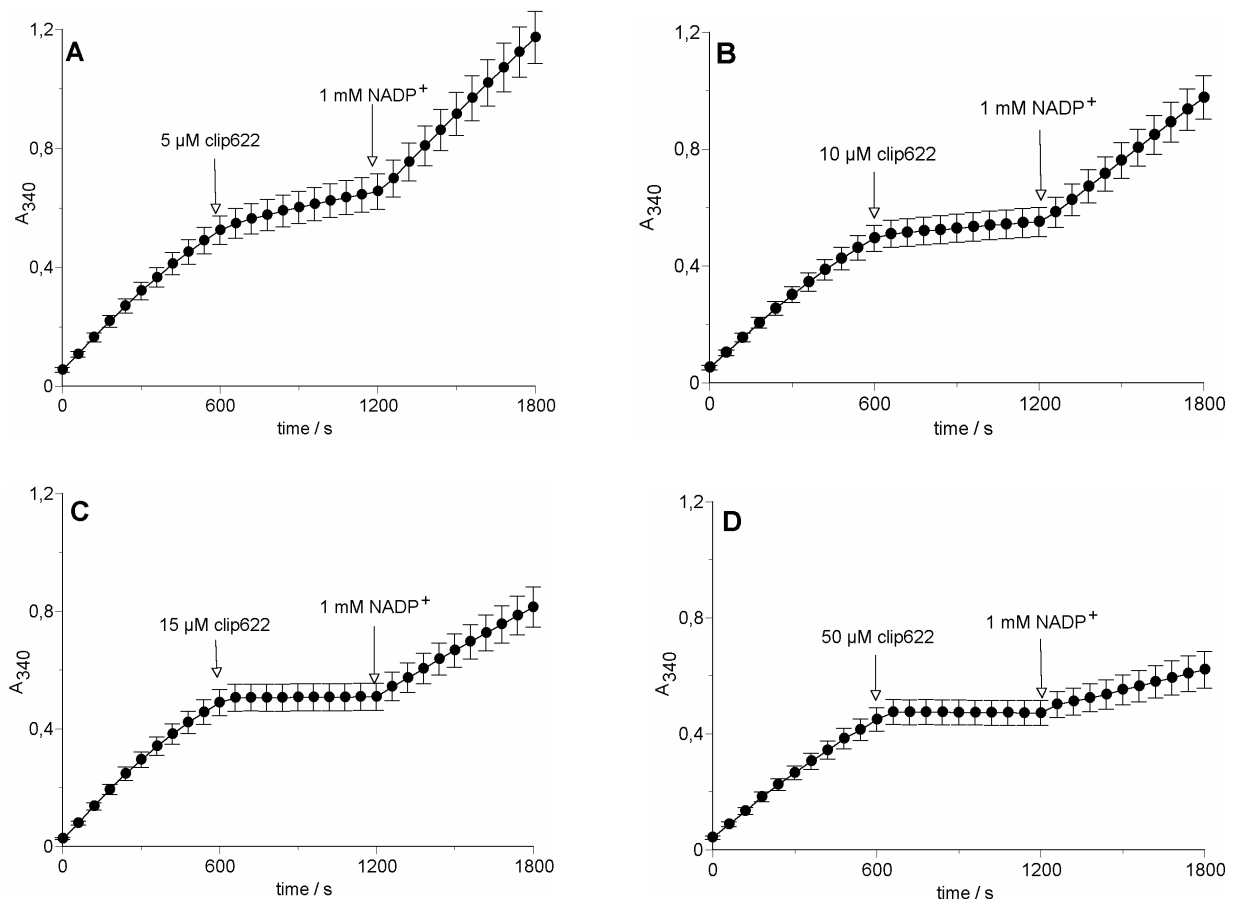


Abbildung 4.53: Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente der G6PD in Abhängigkeit von Clip **622** und Cofaktor NADP⁺. Die Inhibition und Reaktivierung der G6PD wurde bei vier unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt (A: 5 μ M, B: 10 μ M, C: 15 μ M, D: 50 μ M).

Allerdings lässt sich die hier beobachtete vollständige Enzym-Inhibition durch den Clip **622** allein mit Hilfe des zuvor bestimmten neuen partiell unkompetitiven Hemm-Mechanismus nicht mehr erklären. Es muss also noch ein weiterer inhibitorischer Effekt vorliegen, der Clip **622** zu einem derartig effektiven Inhibitor gegenüber der G6PD befähigt. Einen ersten Hinweis darauf lieferte der in Abbildung 4.54 dargestellte Lineweaver-Burk-Plot bei variabler Substratkonzentration.

4.3.2.5 Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots bei variabler Substratkonzentration

Demnach liegt ein gemischter Substrat-Hemm-Mechanismus vor. Es wird angenommen, dass der nichtkompetitive Anteil dieses gemischten Hemm-Mechanismus in einer Konformationsänderung begründet liegt, die durch die Bildung des ternären Komplexes in der gegenüberliegenden „Rossmann-Spalte“ induziert wird.

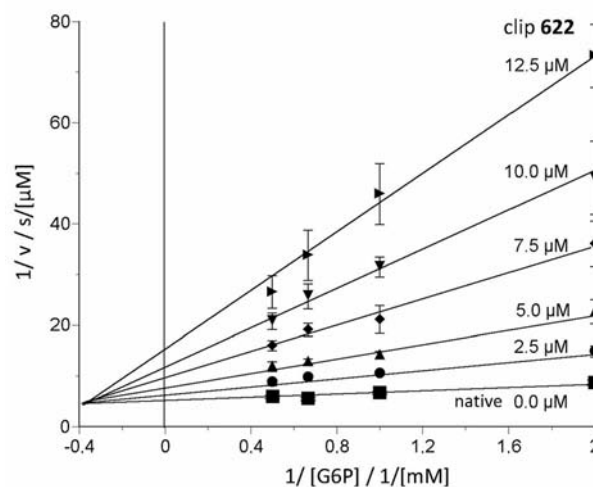


Abbildung 4.54: Lineweaver-Burk-Plots des Clips **622** bei variabler Substratkonzentration.

Demnach konkurriert Clip **622** neben seiner Funktion als $NADP^+$ -Falle nicht nur um die Cofaktor-Bindungsstelle unter Ausbildung eines ternären Komplexes, sondern zudem auch noch um die Substrat-Bindungsstelle. Clip **622** übt damit insgesamt drei Funktionen aus und nicht nur zwei, wie zunächst vermutet wurde. Die äußerst effektive Inhibition der G6PD durch den Clip **622** ist also auf zwei unterschiedliche Hemm-Mechanismen zurückzuführen, die stets gleichzeitig vorliegen. Im Gegensatz zu den klassischen Inhibierungs-Beispielen, bei

denen jeweils nur eine Position durch den Inhibitor eingenommen wird, besetzt hier der Clip **622** sowohl die Cofaktor-Bindungsstelle als auch die Substrat-Bindungsstelle. Dies erklärt den ungewöhnlichen Schnittpunkt im ersten x,y-Quadranten, der bei der Auftragung nach Whiteley zu beobachten war.

In diesem Zusammenhang wurde zudem die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass Clip **622** eventuell auch in der Lage sein könnte, an der Substrat-Bindungsstelle mit Glucose-6-phosphat einen zweiten ternären Komplex auszubilden. Diese Annahme konnte allerdings mittels ^1H -NMR-Titration des Clips **622** mit dem Substrat G6P schnell widerlegt werden. Die ^1H -NMR-Titration zeigte keine Protonenverschiebungen des Gastes G6P, so dass eine Komplexierung des Substrats durch den Clip **622** ausgeschlossen werden kann. Die hohe inhibitorische Effizienz des Clips **622** lässt sich demnach nur mit der Kombination beider beobachteter Hemm-Mechanismen erklären. Nur unter der Annahme, dass beide Hemm-Mechanismen, der partiell unkompetitive Hemm-Mechanismus, der die Bildung des ternären Komplexes zwischen Clip **622**, dem Cofaktor NADP^+ und dem Enzym G6PD beschreibt, und der gemischte Substrat Hemm-Mechanismus, der die Bildung eines binären Komplexes zwischen Clip **622** und der G6P-Bindungsstelle beschreibt, gleichzeitig vorliegen, lässt sich die für die vollständige G6PD-Hemmung erforderliche inhibitorische Wirkung des Clips **622** erklären. Um diesen ungewöhnlichen Hemm-Mechanismus, insbesondere den ternären Komplex, noch eindeutiger charakterisieren zu können, wurden in Zusammenarbeit mit J. Polkowska, F. Bastkowski und K. Kowski sowohl Fluoreszenztitrations als auch ITC-Messungen durchgeführt. Wie bereits gezeigt werden konnte, hat sich die Methode der spektrofluorimetrischen Titration zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D der Komplexe zwischen NADP^+ und den beiden Clips **606** und **622** als äußerst zuverlässig erwiesen. Die bei der Titration detektierten Intensitätsänderungen der Emissionsbanden beider Clips **606** und **622** konnten jeweils auf deren Komplexbildung mit dem Cofaktor NADP^+ zurückgeführt werden. Der Cofaktor NADP^+ wies dabei keine Eigenfluoreszenz auf. Ein wesentlich komplexerer Sachverhalt ergab sich bei der titrimetrischen Untersuchung der beiden Clips **606** und **622** mit dem Enzym G6PD. Im Gegensatz zu NADP^+ zeigt das Enzym G6PD bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm eine Emissionsbande bei 340 nm. Diese Eigenfluoreszenz der G6PD ist auf die Anregung der auf der Proteinoberfläche befindlichen aromatischen Aminosäuresequenzen wie z. B. der Tryptophane, zurückzuführen. Aufgrund der Überschneidung der Emissionsbanden beider Clips mit der des Enzyms war eine Auswertung nur erschwert möglich. Ein Ansatz bestand darin, die Eigenfluoreszenz des

Enzyms und die des Clips, die zuvor mit Hilfe eines Fluoreszenztitrations-Verdünnungs-experimentes bestimmt wurden, von der Fluoreszenz der Substanzmischung zu separieren. Allerdings führte dieser Ansatz in keinem Fall zu einem sinnvollen Ergebnis. Die Fluoreszenztitration hat sich damit als ungeeignete Methode erwiesen, um die Wechselwirkungen zwischen den beiden Clips und dem Enzym zu untersuchen bzw. den postulierten ternären Komplex zwischen Clip **622**, G6PD und NADP^+ eindeutig nachweisen zu können. Es musste also nach einer neuen Methode gesucht werden, mit der sich die Komplexierungsexperimente zwischen Clip und Enzym bewerkstelligen ließen. Die ITC-Methode stellte eine Lösung dieses Problems dar.^[141, 142] Mit ihrer Hilfe ließen sich die Assoziationsexperimente problemlos realisieren. Ein weiterer Vorteil dieser ITC-Methode besteht darin, dass sie neben der Assoziationskonstanten K_a auch noch Informationen über die Gibbs-Assoziationsenthalpie ΔG , die Assoziationsenthalpie ΔH , die Assoziationsentropie ΔS und die Stöchiometrie n liefert.

4.3.2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Bevor die Bildung des postulierten ternären Komplexes mittels ITC-Messung untersucht wurde, sollten zunächst die Bindungskonstanten der beiden Clips **606** und **622** mit dem Enzym G6PD bestimmt werden. Wie aus den in der Abbildung 4.55 dargestellten ITC-Spektren hervorgeht, lässt sich im Fall des Clips **606** keine Assoziation mit dem Enzym feststellen. Die erhaltene Titrationskurve entspricht nicht dem klassischen sigmoidalen Verlauf und die resultierende positive Assoziationsenthalpie ΔH (Tabelle 4.5) deutet sogar auf einen endothermen Prozess hin. Dies spricht eindeutig gegen die Bildung des entsprechenden Clip **606**-Enzym-Komplexes.

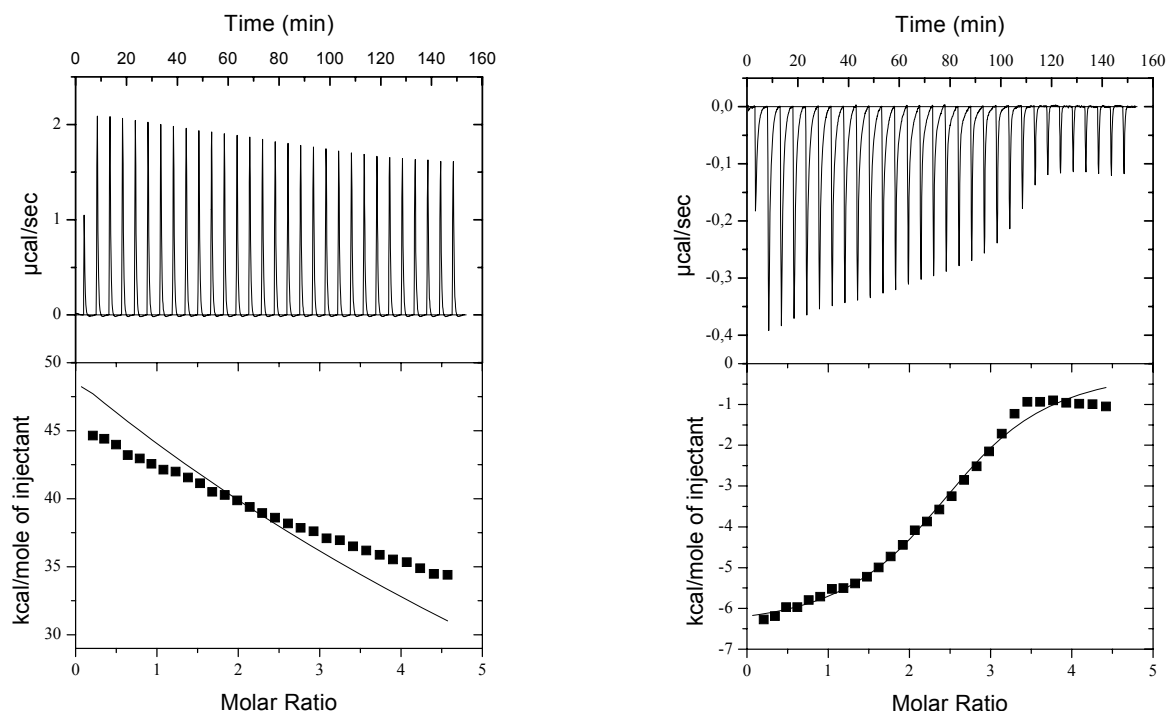


Abbildung 4.55: ITC-Spektren zur Bestimmung der Assoziationskonstanten K_a der Enzym/Inhibitor-Komplexe. Links: Titration des Enzyms G6PD ($7.84 \cdot 10^{-6}$ M) mit dem Clip **606** ($1.57 \cdot 10^{-4}$ M). Rechts: Titration des Enzyms G6PD ($1.96 \cdot 10^{-6}$ M) mit dem Clip **622** ($3.78 \cdot 10^{-4}$ M).

	ΔH [kcal/mol]	K_a [M^{-1}]	n	ΔS [cal/mol · K]	-T ΔS [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]
G6PD + Clip 606	-	-	-	-	-	-
G6PD + Clip 622	-6.578 ± 0.1180	305000 \pm 34000	2.60 \pm 0.033	3.03	-0.90	-7.48

Tabelle 4.5: Die zu den ITC-Spektren dazugehörigen Bindungskonstanten, Stöchiometriefaktoren, sowie thermodynamischen Größen.

Für Clip **622** findet dagegen eine starke Bindung zum Enzym statt. Die erhaltene Dissoziationskonstante K_D beträgt für den Clip **622**-Enzym-Komplex etwa 3 μM . Die Titrationskurve zeigt den typischen sigmoidalen Verlauf und auch die negative Assoziationsenthalpie ΔH von -6.6 kcal/mol spricht eindeutig für die starke Komplexbildung. Dieses Ergebnis bekräftigt das zuvor durchgeführte Ultrafiltrationsexperiment, das ebenfalls einen starken Inhibitor-Enzym-Komplex vermuten ließ. Da der Bis-Phosphonat Clip **606** im Gegensatz zum Bis-Phosphat Clip **622** keine Bindung zum Enzym aufweist, muss das Enzym also mindestens über eine Bindungstasche verfügen, die bevorzugt von Phosphat-Anionen

besetzt ist. Des Weiteren liefert diese ITC-Messung zwischen Clip **622** und G6PD anhand des Stöchiometriefaktors n von 2:1 (Clip **622**/G6PD) einen ersten entscheidenden Hinweis auf die zuvor postulierte gleichzeitige Besetzung zweier Enzymbindungsstellen durch den Clip **622**, nämlich die der Cofaktor-Bindungsstelle und die der Substrat-Bindungsstelle. Dies würde also für eine Kombination beider Hemm-Mechanismen, dem partiell unkompetitiven Hemm-Mechanismus und dem gemischten Substrat Hemm-Mechanismus, sprechen. Zusätzliche ITC-Experimente sollten dieses Postulat auf seine Richtigkeit hin überprüfen. Falls wirklich ein Wechselspiel zwischen den beiden Hemm-Mechanismen vorliegt, müssten sich durch Zugabe von Clip **622** und Cofaktor NADP^+ zum Enzym G6PD, unabhängig von der Reihenfolge, jeweils zwei begünstigte exotherme Schritte ergeben. Diese würden dann die sukzessive Bildung eines binären und ternären Komplexes widerspiegeln.

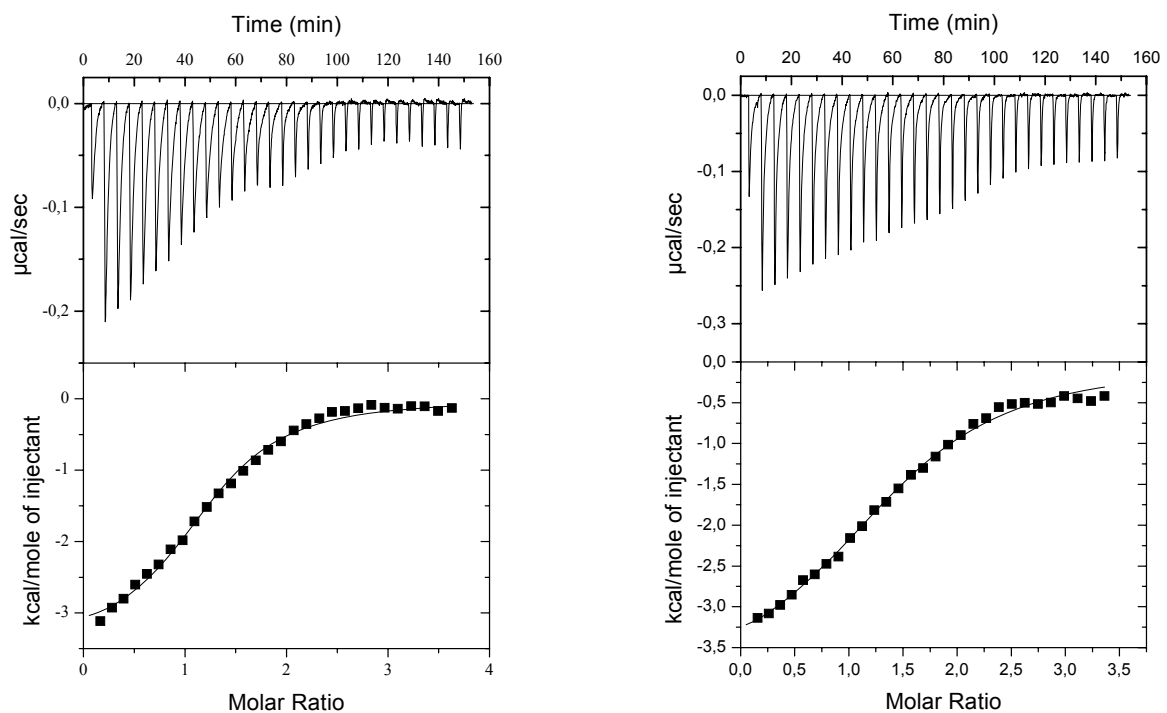


Abbildung 4.56: ITC-Spektren zur Überprüfung der sukzessiven Komplexbildung zwischen G6PD, Clip **622** und NADP^+ unter Ausbildung des ternären Komplexes bei unterschiedlicher Reihenfolge der Zugabe. Links: Enzym G6PD ($3.92 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) und Cofaktor NADP^+ ($4.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) werden vorgelegt und Clip **622** ($6.21 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) wird dazu titriert. Rechts: Enzym G6PD ($3.92 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) und Clip **622** ($3.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) werden vorgelegt und der Cofaktor NADP^+ ($5.75 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) wird dazu titriert.

Wie man den ITC-Spektren in Abbildung 4.56 entnehmen kann, weisen beide Titrationskurven einen sigmoidalen Verlauf auf. Unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe von Clip **622** und Cofaktor NADP^+ zum Enzym G6PD ergibt sich jeweils eine negative Gibbs-Assoziationsenthalpie ΔG , die für eine starke Komplexbildung spricht. Dafür sprechen auch die jeweils erhaltenen Assoziationskonstanten. (Tabelle 4.6)

	ΔH [kcal/mol]	K_a [M^{-1}]	n	ΔS [cal/mol · K]	-T ΔS [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]
[G6PD+NADP ⁺] + Clip 622	-3.461 ± 0.084	154 000 ± 15 000	1.22 ± 0.02	12.10	-3.61	-7.07
[G6PD+Clip 622] + NADP ⁺	-3.97 ± 0.1	76 300 ± 6 000	1.47 ± 0.03	9.01	-2.68	-6.65

Tabelle 4.6: Die zu den ITC-Spektren dazugehörigen Assoziationskonstanten, Stöchiometriefaktoren, sowie thermodynamischen Größen.

Die detaillierten mikrokalorimetrischen Untersuchungen bestätigen damit die Hypothese, dass Clip **622** sowohl an die Substrat- als auch an die Cofaktor-Bindungsstelle bindet unter Ausbildung eines binären und ternären Komplexes mit jeweils einem Inhibitor-Molekül. Anhand der mittels ITC gewonnen Erkenntnisse und thermodynamischen Daten, die in Tabelle 4.6 aufgeführt sind, lässt sich für die ungewöhnliche Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch den Clip **622** das in Abbildung 4.57 dargestellte thermodynamische Bild zusammenstellen. Danach kann die Gibbs-Assoziationsenthalpie ΔG des ternären Komplexes aus den thermodynamischen Daten der einzelnen Komponenten auf zwei unterschiedliche Weisen berechnet werden. Beide Wege, die sich nur durch die Reihenfolge der Zugabe von Clip **622** und Cofaktor NADP^+ zum Enzym G6PD unterscheiden, ergeben dabei jeweils den gleichen Gesamtbetrag der insgesamt frei gewordenen Gibbs-Assoziationsenthalpie ΔG .

Der erste Weg, bei dem die Zugabe des Clips **622** vor der Zugabe des Cofaktors NADP^+ zum Enzym G6PD erfolgt, führt zu einem binären Clip-Enzym-Komplex. Es wird angenommen, dass in diesem Fall der Clip **622** zunächst das Substrat G6P aus dessen Bindungsstelle verdrängt. Durch anschließende Zugabe des Cofaktors NADP^+ bindet vermutlich ein weiteres Clip-Molekül an die Cofaktor-Bindungsstelle unter gleichzeitiger Ausbildung des vergleichsweise stabileren ternären Komplexes.

Der zweite Weg sieht dagegen zunächst die Zugabe des Cofaktors NADP^+ vor. Es resultiert ebenfalls ein binärer Komplex, bei dem der Cofaktor die klassische „Rossmann-Spalte“ besetzt. Durch anschließende Zugabe des Clips **622** wird dieser Enzym-Cofaktor-Komplex durch den wesentlich stabileren ternären Komplex ersetzt. Gleichzeitig besetzt der Inhibitor wie schon zuvor die Substrat-Bindungsstelle.

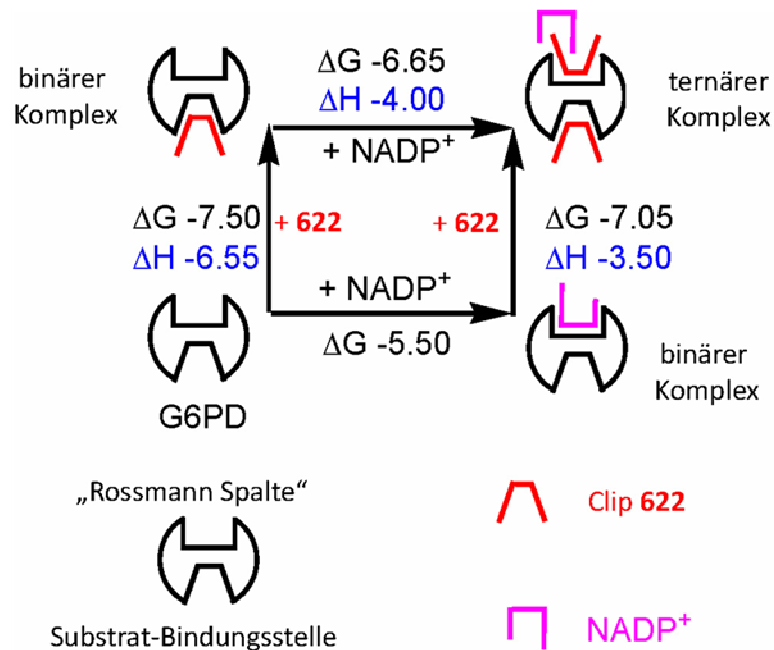


Abbildung 4.57: Thermodynamisches Schema für die sukzessive Bildung des ternären Komplexes zwischen G6PD, Clip **622** und NADP^+ . Die Gibbs-Assoziationsenthalpie ΔG des ternären Komplexes lässt sich aus den thermodynamischen Daten der einzelnen Komponenten auf zwei unterschiedliche Weisen berechnen. Beide Wege führen dabei zum gleichen Ergebnis. Die Freie Enthalpie beträgt für beide Wege ungefähr -13 kcal/mol.

4.3.2.7 Vergleich mit anderen Dehydrogenasen

Als nächstes wurde überprüft, ob dieser seltene Hemm-Mechanismus durch Clip **622** ausschließlich auf die G6PD beschränkt ist. In diesem Zusammenhang wurden in einer Art „Screening“ die IC_{50} -Werte vier weiterer Dehydrogenasen ermittelt. Die Tabelle 4.7 fasst die IC_{50} -Werte der einzelnen Dehydrogenasen unter Berücksichtigung der jeweils eingesetzten Cofaktorkonzentrationen zusammen. Wie anhand der IC_{50} -Werte deutlich zu erkennen ist, weist keine der hier untersuchten Dehydrogenasen eine zur G6PD ähnlich effektive Hemmung durch den Clip **622** auf. Damit ist der hier nachgewiesene neue Hemm-Mechanismus durch den Clip **622** nur für die G6PD spezifisch.

Enzym	Cofaktor	Inhibitor	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ /Cofaktor
ADH ^[108]	NAD ⁺ (1800 μM)	Clip 622	1500	0.8
GDH	NAD ⁺ (200 μM)	Clip 606	>1000	>4.0
GDH	NAD ⁺ (200 μM)	Clip 622	330 ± 25	1.5
GDH	NADP ⁺ (200 μM)	Clip 622	255 ± 20	1.3
G6PD	NADP ⁺ (200 μM)	Spacer 406	>500	>2.5
G6PD	NADP ⁺ (200 μM)	Clip 606	350 ± 35	1.75
G6PD	NADP ⁺ (200 μM)	<i>S</i> -NADP ⁺	115 ± 5	0.58
G6PD	NADP ⁺ (200 μM)	Spacer 422	53 ± 3	0.27
G6PD	NADP ⁺ (200 μM)	Clip 622	7 ± 1	0.03
FDH	NAD ⁺ (1800 μM)	Clip 622	43 ± 3	0.02
GAPDH ^[143]	NAD ⁺ (400 μM)	Clip 622	56 ± 2	0.14

Tabelle 4.7: Übersicht der ermittelten IC₅₀-Werte verschiedener Dehydrogenasen in Gegenwart der Inhibitoren Clip **606** und **622**, sowie der Spacer **406** und **422** unter Berücksichtigung der jeweils eingesetzten Cofaktorkonzentration. Zur Bestimmung des IC₅₀-Werts der GAPDH musste ein spezieller Puffer verwendet werden. Die Zusammensetzung des Assays sah hier wie folgt aus: GAPDH (15 nM), AsO₄³⁻ (420 μM), PO₄³⁻ (5 mM), GAP (1.6 mM), NAD⁺ (100-800 μM), NaHCO₃ (100 mM), pH 8.6, EDTA (100 μM). Die Bestimmung der IC₅₀-Werte aller anderen Dehydrogenasen erfolgte analog zu der der G6PD.

Da die Glucose-Dehydrogenase im Vergleich zu den übrigen vier Dehydrogenasen die größte Ähnlichkeit zur Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aufweist, wurde in ihrem Fall auch die Kinetik in Gegenwart der beiden Clips **606** und **622** untersucht. GDH katalysiert die Oxidation von Glucose zu Glucono-δ-lacton unter gleichzeitiger Reduktion des Cofaktors NAD⁺ bzw. NADP⁺ zu NADH bzw. NADPH.

Wie man den Lineweaver-Burk-Plots in Abbildung 4.58 bei variabler Cofaktorkonzentration entnehmen kann, folgt die GDH in Gegenwart des Clips **606** einem gemischten Hemm-Mechanismus. Für Clip **622** ergibt sich dagegen ein kompetitiver Hemm-Mechanismus und nicht der seltene partiell unkompetitive Hemm-Typ, wie er bereits zuvor für die G6PD nachgewiesen werden konnte.

Die Inhibition der GDH durch die beiden Clips **606** und **622** beruht daher ausschließlich auf dem Cofaktor-Abfang. Dafür sprechen auch die IC₅₀-Werte beider Inhibitoren, die hinsichtlich der eingesetzten Cofaktorkonzentration annähernd äquimolar sind.

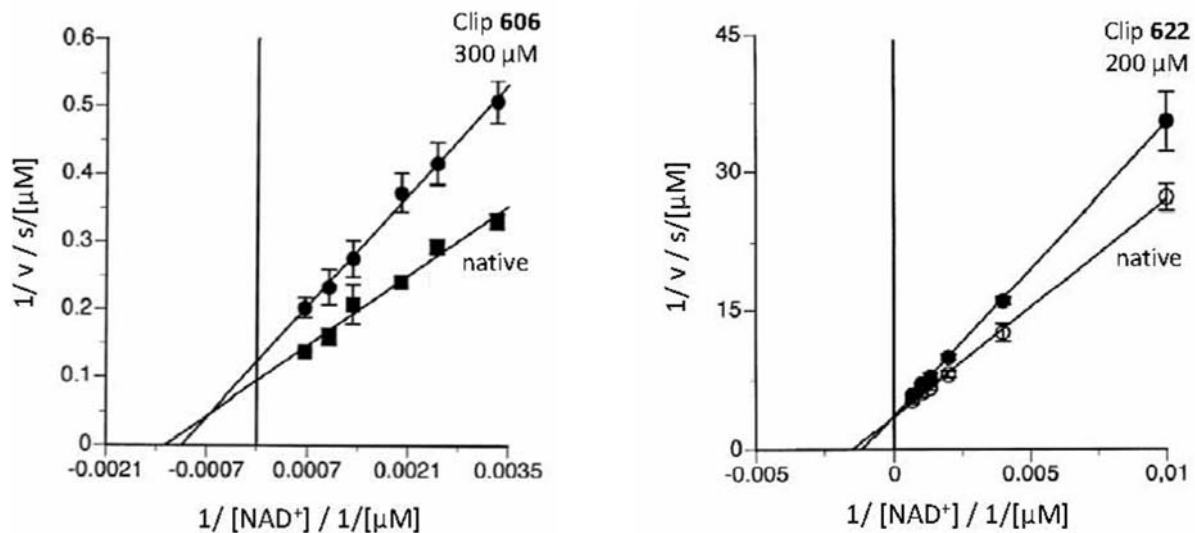


Abbildung 4.58: Lineweaver-Burk-Plots der beiden Clips **606** und **622** im Fall der GDH bei variabler NAD^+ -Konzentration.

Im Fall des Clips **606** wurde der kompetitive Hemm-Mechanismus zusätzlich anhand eines klassischen Inhibitions- und Reaktivierungsexperiments belegt. Dazu wurde zunächst der klassische GDH-Assay in Kalium-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.6, 37 °C) vorbereitet. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms GDH gestartet. Nach 600 s wurde diese durch Zugabe des Clips **606** unterbunden. Nach weiteren 600 s Inkubationszeit des Clips **606** wurden dem Assay zusätzliche Äquivalente Cofaktor NAD^+ bzw. $NADP^+$ hinzugefügt. Wie man der Abbildung 4.59 entnehmen kann, lässt sich die enzymatische Oxidation von Glucose zu Glucono- δ -lacton bis zu 100 % wieder reaktivieren.

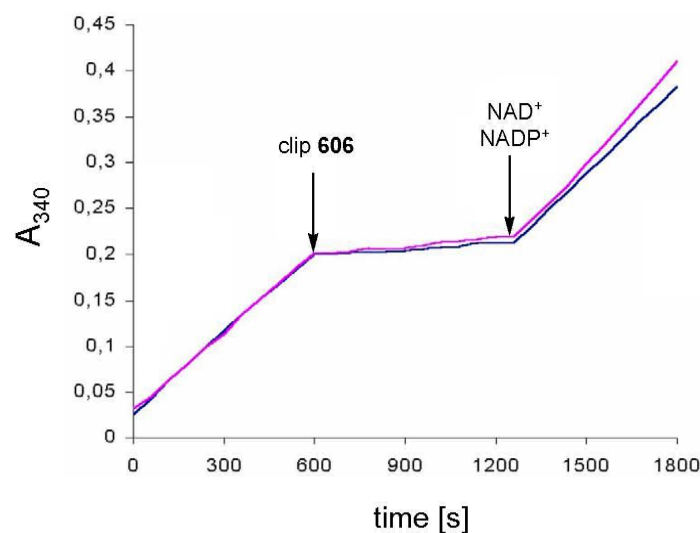


Abbildung 4.59: Inhibitions- und Reaktivierungsexperiment der GDH in Abhängigkeit der beiden bestimmenden Komponenten Clip **606** und NAD^+ bzw. $NADP^+$.

Mit Hilfe des molekularen Modellings sollte schließlich der komplexe Zusammenhang des für die G6PD nachgewiesenen neuen Hemm-Mechanismus mit dem Clip **622**, der die Bildung eines binären und ternären Komplexes beinhaltet, veranschaulicht werden.

4.3.2.8 Molecular Modelling

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine intensive Recherche aller in der Proteindatenbank zugänglichen Röntgenstrukturen der menschlichen G6PD durchgeführt. Die beiden Kristallstrukturen mit den PDB-Codes 2BHL und 2BH9 haben sich dabei als besonders geeignet erwiesen.^[144, 145] Während die Kristallstruktur 2BHL nur das katalytische NADP^+ als Komplex in der „Rossmann-Spalte“ der G6PD enthält, können mit Hilfe der Kristallstruktur 2BH9 sowohl die Lage des strukturellen NADP^+ als auch die des Substrates G6P in ihren natürlichen Bindungsstellen identifiziert werden. Diese beiden ansonsten völlig identischen Kristallstrukturen wurden anschließend miteinander vereinigt, so dass sich eine „universelle“ Röntgenstruktur der G6PD ergab, die alle drei Komponenten, das katalytische NADP^+ , das strukturelle NADP^+ und das Substrat G6P, enthielt. Diese einheitliche Röntgenstruktur der G6PD wurde für alle weiteren Modell-Versuche und MD-Simulationen herangezogen. In diesem Zusammenhang sollte noch kurz erwähnt werden, dass die katalytische Aktivität der G6PD durch das strukturelle NADP^+ in keiner Weise beeinflusst wird. Dies ist, wie bereits zuvor erwähnt wurde, auf dessen Lage zurückzuführen. Im Gegensatz zum katalytischen NADP^+ befindet sich das strukturelle NADP^+ an der Dimeren-Schnittstelle, weit von der Substrat-Bindungsstelle entfernt. Aufgrund dieser Tatsache und seiner etwa 100mal niedrigeren Enzym-Dissoziationskonstanten K_D von 40 nM im Vergleich zu der des Clips **622** von 3 μM sollte das strukturelle NADP^+ bei der Inhibition der G6PD durch den Clip **622** keine entscheidende Rolle spielen.^[128]

Als erstes erfolgte eine genaue Analyse der katalytischen Bindungsdomäne des Cofaktors NADP^+ hinsichtlich eventuell vorhandener Bindungsmöglichkeiten für den Inhibitor **622**. Dabei wurde insbesondere der Ausschnitt der „Rossmann-Spalte“ inspiziert, der vom dritten Phosphat-Anion des Cofaktors NADP^+ besetzt wird. Denkbar wäre nun, dass diese dritte Phosphat-Einheit durch einen der beiden Phosphat-Substituenten des Clips **622** ersetzt werden könnte. Der freie Argininrest (Arg-72) sowie andere Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren in unmittelbarer Umgebung dieser Bindungsstelle, die zunächst dieses dritte Phosphat-Anion stabilisieren, könnten dann im Fall der Cofaktor-Verdrängung durch den Inhibitor zu einer

Stabilisierung des entsprechenden Phosphat-Substituenten des Clips **622** beitragen. Die Kraftfeld-Berechnung dieses virtuellen Ersatzes von NADP^+ durch den Clip **622** lieferte eine metastabile Komplexstruktur mit nur einer in der „Rossmann-Spalte“ gebundenen Phosphat-Gruppe. Diese Struktur ist in der Abbildung 4.60 dargestellt. Indem die Adenin-Hälfte des Cofaktors in der nach oben hin geöffneten Kavität des Clips gebunden wird und der Nikotinamidring gleichzeitig in die Nähe des Substrats G6P ragt, bildet sich ein recht stabiler Komplex. Anhand dieses Komplexes lässt sich nun der erste Teil des ungewöhnlichen Hemm-Mechanismus der G6PD mit Clip **622**, die partiell unkompetitive Inhibition, anschaulich erklären. Obwohl sich der Cofaktor NADP^+ nicht in seiner natürlichen „Active Site“ befindet, da diese vom Inhibitor besetzt wird, kann dieser trotzdem im ternären Komplex mit dem Clip **622** eine Position einnehmen, die für die enzymatische Umsetzung essentielle Hydridübertragung des Substrats G6P auf dessen Nikotinamidring ermöglicht. Allerdings verläuft dieser katalytische Vorgang langsamer als der natürliche. Es findet also eine partielle Inhibition statt. Anschließend wurde der ternäre Komplex einer Moleküldynamik ausgesetzt. Anhand dieser MD-Simulation konnte demonstriert werden, dass der ternäre Komplex auch über einen Zeitraum von einer halben Nanosekunde stabil blieb. Innerhalb dieses Zeitintervalls fand eine Neuorientierung mehrerer freier basischer Aminosäurenreste (Lys-171, Arg-246) statt. Es kam zur Ausbildung neuer Ionenpaarbindungen sowohl zu der noch freien Phosphat-Gruppe des Clips **622** als auch zu der Pyrophosphat-Einheit des komplexierten Cofaktors. Dieser zusätzlichen Stabilisierung verdankt der ternäre Komplex seine hohe Stabilität.

Der zweite Teil dieses komplexen Inhibitions-Mechanismus, mit dem sich erst die hohe inhibitorische Effizienz des Clips **622** bzgl. G6PD erklären lässt, liegt dagegen in der Substrat-Bindungstasche begründet. Diese befindet sich in unmittelbarer Nähe der „Rossmann-Spalte“. Wie man der Abbildung 4.61 entnehmen kann, lieferte die Kraftfeld-Berechnung des virtuellen Ersatzes von G6P durch den Clip **622** eine äußerst stabile Komplexstruktur. Die dort vorhandenen zahlreichen basischen Aminosäurenreste (Arg-365, Lys-205 und Lys-47) üben optimale Wechselwirkungen mit den beiden Phosphat-Substituenten des Clips **622** aus. Ferner erfolgt eine zusätzliche Komplexstabilisierung durch die Ausbildung einer π - π -Stapelwechselwirkung des Histidins His-201 zu einer der beiden Naphthalinseitenwände des Clips.

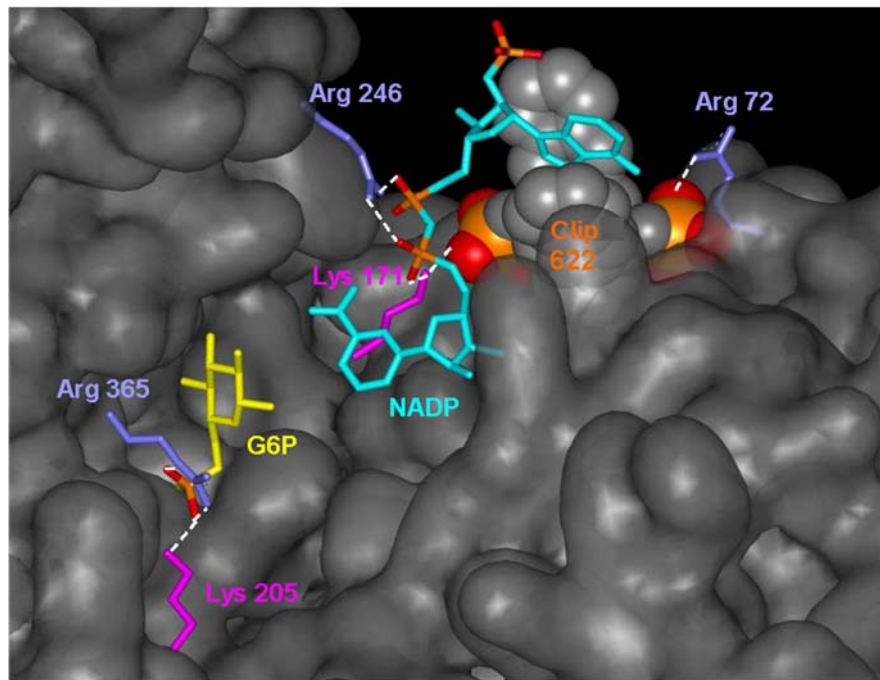


Abbildung 4.60: MD-Simulation des ternären Komplexes ausgehend von der „universellen“ Kristallstruktur der menschlichen G6PD, die sich aus einer Kombination der beiden PDB-Kristallstrukturen 2BHL und 2BH9 ergibt. Die Bildung des ternären Komplexes erfolgt durch virtuellen Ersatz des Cofaktors NADP^+ durch den Clip **622** und anschließender Komplexierung des Cofaktors in der Kavität des Inhibitors (MacroModel 9.0, Wasser, OPLS-A, 300 K, 0.6 ns).

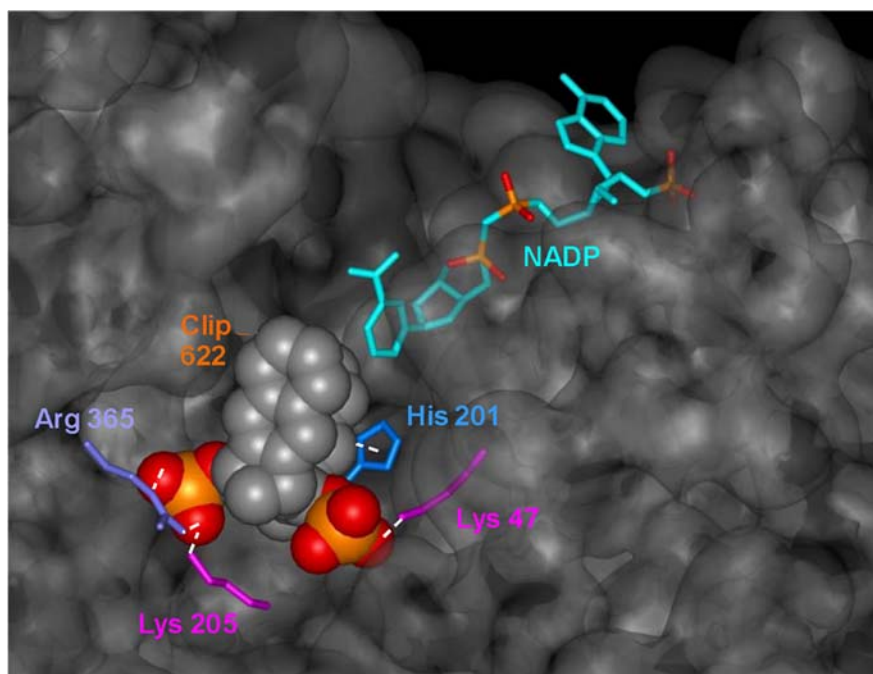


Abbildung 4.61: Kraftfeld-Berechnung des binären Komplexes ausgehend von der „universellen“ Kristallstruktur der menschlichen G6PD, die sich aus einer Kombination der beiden PDB-Kristallstrukturen 2BHL und 2BH9 ergibt. Die Kraftfeld-Berechnung des binären Komplexes erfolgt durch virtuellen Ersatz des Substrats G6P durch den Clip **622** in der Substrat-Bindungsstelle (MacroModel 9.0, Wasser).

Wie man den beiden Abbildungen 4.60 und 4.61 entnehmen kann, lassen sich mit Hilfe des molekularen Modellings alle drei Funktionen des Clips **622**, auf denen seine hohe inhibitorische Effizienz zurückzuführen ist, visuell zusammenfassen. Zu diesen zählen neben seiner Funktion als NADP⁺-Falle die gleichzeitige Besetzung der Substrat-Bindungsstelle und der „Rossmann-Spalte“ unter Bildung eines binären und ternären Komplexes mit jeweils einem Inhibitor-Molekül.

4.3.2.9 Aufklärung der inhibitorischen Effizienz des Tweezers 750 gegenüber der G6PD

Im Fall der Alkohol-Dehydrogenase haben sich die beiden Tweezers **734** und **750** als wesentlich effektivere Inhibitoren gegenüber den beiden Clips **606** und **622** erwiesen.^[108] Ob dies auch für die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zutrifft, soll demnächst im Rahmen dieses Kooperationsprojektes eindeutig geklärt werden. Bisherige Untersuchungen ergaben für den Tweezer **750** einen IC₅₀-Wert von etwa 0.9 µM. Damit stellt der Tweezer **750** einen etwa zehnmal effektiveren Inhibitor gegenüber dem Clip **622** dar. Eine vergleichbar höhere inhibitorische Effizienz des Tweezers **750** (IC₅₀ = 1.52 mM) gegenüber dem Clip **622** (IC₅₀ = 0.18 mM) konnte bereits für die ADH nachgewiesen werden.

Da der Tweezer **750** den Cofaktor NADP⁺ im Gegensatz zum Clip **622** nur sehr schwach bindet, kann seine inhibitorische Effizienz nicht auf der Ausbildung eines ternären Komplexes beruhen. Es muss folglich ein anderer Hemm-Mechanismus vorliegen. Einen ersten Hinweis darauf, dass seine inhibitorische Effizienz analog zur ADH in der Komplexbildung kritischer basischer Aminosäurenreste auf der Proteinoberfläche begründet liegt, lieferte ein klassisches Inhibitions- und Reaktivierungsexperiment der G6PD. Dieses Experiment wurde von der Kooperationsgruppe am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Wie im Fall der ADH lässt sich auch hier die enzymatische Aktivität der G6PD nach vorausgegangener vollständiger Inhibition durch den Tweezer **750** durch Zugabe des Lysin-Derivats Ac-Lys-OMe wieder reaktivieren. Ob sich für die G6PD in Gegenwart des Inhibitors **750** ebenfalls ein nichtkompetitiver Hemm-Mechanismus ergibt, werden künftige kinetische Untersuchungen unter anderem die Lineweaver-Burk-Plots zeigen.

In mehreren Literaturstellen wird insbesondere auf drei kritische basische Aminosäurenreste hingewiesen, die für die katalytische Aktivität der G6PD essentiell sein könnten. Dazu zählen die beiden Lysine Lys-205 und Lys-407, sowie das Arginin Arg-46. Alle drei kritischen Aminosäurenreste stellen damit potentielle Ziele für den Tweezer **750** dar.^[120, 146] Laut Literatur spielt das Lysin Lys-205, das Bestandteil des konservierten „Neun-Aminosäurenreste-Peptids“ (RIDHYLGKE, Aminosäurenreste 198-206 der menschlichen G6PD) ist, eine entscheidende Rolle bei der Substrat-Bindung und Katalyse der menschlichen G6PD. Eine Komplexierung dieses Lysins durch den Tweezer könnte die Bindung des Substrats G6P empfindlich stören oder sogar vollständig verhindern und dadurch die Inhibition der G6PD induzieren. Dem Lysin Lys-407 wird dagegen eine tragende Rolle bei der Ausbildung der aktiven Dimerenform zugesprochen. In jeder Dimeren-Schnittstelle werden insgesamt vier Salzbrücken von Glu-206 zu Lys-407 und Glu-419 zu Arg-427 ausgebildet. Von diesen ist nur das Lysin Lys-407 vollständig konserviert. Erfolgt nun eine Komplexierung dieses Lysins Lys-407 durch den Tweezer **750**, dann könnten sich die Salzbrücken und folglich die aktiven Dimeren der G6PD nicht mehr ausbilden. Die Folge wäre ebenfalls Inhibition der G6PD. Das Arginin Arg-46 ist dagegen an der Bindung des Cofaktors NADP^+ in der „Rossmann-Spalte“ beteiligt. Denkbar wäre nun, dass der Komplex des Tweezers **750** mit diesem Arginin Arg-46 dem Cofaktor NADP^+ den Zugang zur „Active Site“ versperren könnte, was letztendlich ebenfalls zur Inhibition der G6PD führen würde. Damit ergeben sich für den Tweezer **750** drei viel versprechende potentielle Angriffspunkte in der G6PD: die „Rossmann-Spalte“, die Substrat-Bindungsstelle und die Dimeren-Schnittstelle. Ob die einzelnen Komplexe dieser kritischen basischen Aminosäurenreste mit dem Tweezer **750** auch wirklich stabil sind, müsste wiederum mittels molekularem Modelling überprüft werden.

4.4 Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase (PARP-1)

4.4.1 Charakterisierung von PARP-1

Unter der Poly-(ADP-Ribosyl)ierung versteht man eine reversible posttranslatorische Modifikationsänderung, die an der Regulation basaler zellulärer Prozesse beteiligt ist.^[147-150] Dazu zählen z. B. die Kontrolle der genomischen Stabilität und das zelluläre Überleben. Die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung wurde erstmals von Chambon *et al.* im Jahre 1963 entdeckt.^[151, 152] Ihre Katalyse erfolgt durch die so genannten Poly-(ADP-Ribose) Polymerasen (PARP-1). Zu dieser PARP-1-Superfamilie gehören nach heutigem Kenntnisstand insgesamt 18 PARP-1-homologe Proteine, die alle die gleiche minimale katalytische Domäne aufweisen.^[153] Dabei ist PARP-1 das bisher am besten untersuchte Protein der PARP-1-Familie. Alle katalysieren die Polymerisation von ADP-Ribose-Einheiten des Substrats NAD^+ auf Akzeptor-Proteine unter Bildung von linearen und verzweigten Polymeren. Von allen 18 Mitgliedern der PARP-1-Familie verfügen nur PARP-1 und PARP-2 über eine DNA-bindende Domäne, deren katalytische Aktivität durch DNA-Schäden hervorgerufen wird. Die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase PARP-1 ist ein im Zellkern lokalisiertes 113 kDa großes und 1014 Aminosäuren langes NAD^+ -katabolisierendes Metalloenzym, das eine zentrale Rolle bei der DNA-Reparatur einnimmt. In jeder Zelle befinden sich etwa 10^6 PARP-1-Moleküle.^[154] Wie die Abbildung 4.63 zeigt, lässt sich PARP-1 in drei funktionelle Domänen unterteilen, die aminoterminal DNA-bindende Domäne (DBD), die zentrale Automodifikations Domäne (AMD) und die carboxyterminale katalytische Domäne (CD).^[147, 155-159]

Die 42 kDa große DBD enthält neben zwei Zinkfinger-Motiven F1 und F2, eine bipartite Kernlokalisationssequenz (NLS *nuclear localisation signal*) mit einer Schnittstelle für das apoptotische Enzym Caspase-3, sowie zwei Helix-Turn-Helix-Motive (HTH). Sowohl die beiden Helix-Turn-Helix-Motive, als auch die beiden Zinkfinger-Motive sind an Wechselwirkungen mit der DNA beteiligt, wobei letztere als DNA-Bruch-Sensoren fungieren.^[147] Beide Zinkfinger-Motive F1 und F2 sind in ihrer Struktur und Funktionalität einzigartig. Sie koordinieren Zn^{2+} -Ionen mit einem Cys-Cys-His-Cys-Motiv und sind mit ihren 28 und 30 Aminosäurenresten im Vergleich zu anderen Zinkfingern, die nur 12 bis 13 Aminosäuren enthalten, ungewöhnlich groß.

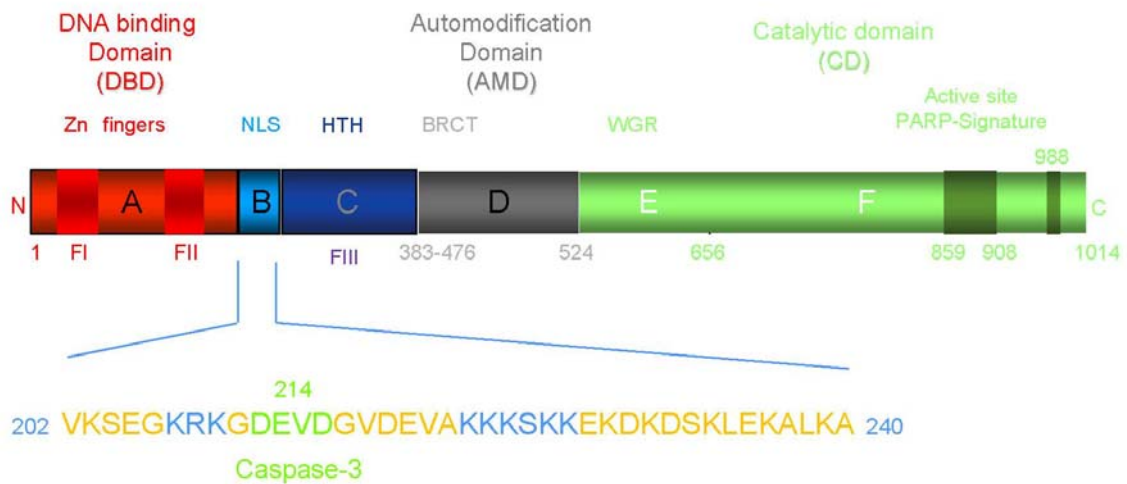


Abbildung 4.62: Funktionelle Domänen der Poly-(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1).^[149] Die N-terminale DNA-bindende Domäne (DBD) enthält zwei Zinkfinger-Motive F1 und F2 (A), eine bipartite Kernlokalisationssequenz (NLS) mit einer Schnittstelle für das apoptotische Enzym Caspase-3 (B), zwei Helix-Turn-Helix Motive (HTH) und eine dritte Zink-bindende Domäne (C). In der zentralen basischen Automodifikations Domäne befindet sich ein BRCT-Motiv (D), das für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich ist. Die C-terminale katalytische Domäne enthält neben einem WGR-Motiv, das Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren eingehen kann, die „Active Site“ von PARP-1 (E, F).

Interessanterweise sind beide Zinkfinger-Motive bei der Erkennung von DNA-Strangbrüchen und der daraus resultierenden Aktivierung des Enzyms nicht gleichwertig erforderlich.^[147, 159] Untersuchungen zeigten, dass ein beschädigter Zinkfinger F1 zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität führt unabhängig von der Art des DNA-Bruchs (DSBs „Double Strand Breaks“ oder SSBs „Single Strand Breaks“). Abbildung 4.63 verschaulicht beide Arten der DNA-Strangbrüche.^[160] Dagegen ist der Verlust der PARP-1-Aktivität im Fall eines beschädigten Zinkfingers F2 lediglich auf DNA-Einzelstrangbrüche beschränkt. Während also Zinkfinger F1 sowohl an DNA-Einzel- als auch an DNA-Doppelstrangbrüche bindet interagiert Zinkfinger F2 nur mit DNA-Einzelstrangbrüchen. Trotz seiner Rolle in der DNA-Reparatur bindet PARP-1 auch relativ stark an ungeschädigte DNA. Diese Wechselwirkungen sind allerdings allein auf die beiden Helix-Turn-Helix-Motive zurückzuführen und für die Aktivierung der katalytischen Aktivität von PARP-1 unbedeutend. Im Allgemeinen bindet PARP-1 an DNA-Strangbrüche, die durch Oxidation, Alkylierung, Desaminierung, ionisierende Strahlung (Röntgen- und γ -Strahlen) oder eine große Anzahl an Anti-Krebs-Mitteln hervorgerufen werden. Die enzymatische Aktivierung von PARP-1 durch DNA-Doppelstrangbrüche ist weitaus weniger wichtig als die Aktivierung

durch DNA-Einzelstrangbrüche. Die Bindung erfolgt elektrostatisch an die DNA-Enden, wobei PARP-1 ein Gebiet von sieben Nukleotiden auf jeder Seite des SSBs bedeckt. Dieser symmetrische Einschluss des DNA-Einzelstrangbruchs, der zur Stabilisierung der charakteristischen V-Form der DNA beiträgt, lässt darauf schließen, dass PARP-1 an DNA-Strangbrüche als homodimeres Protein MW = 2x113 kDa bindet.

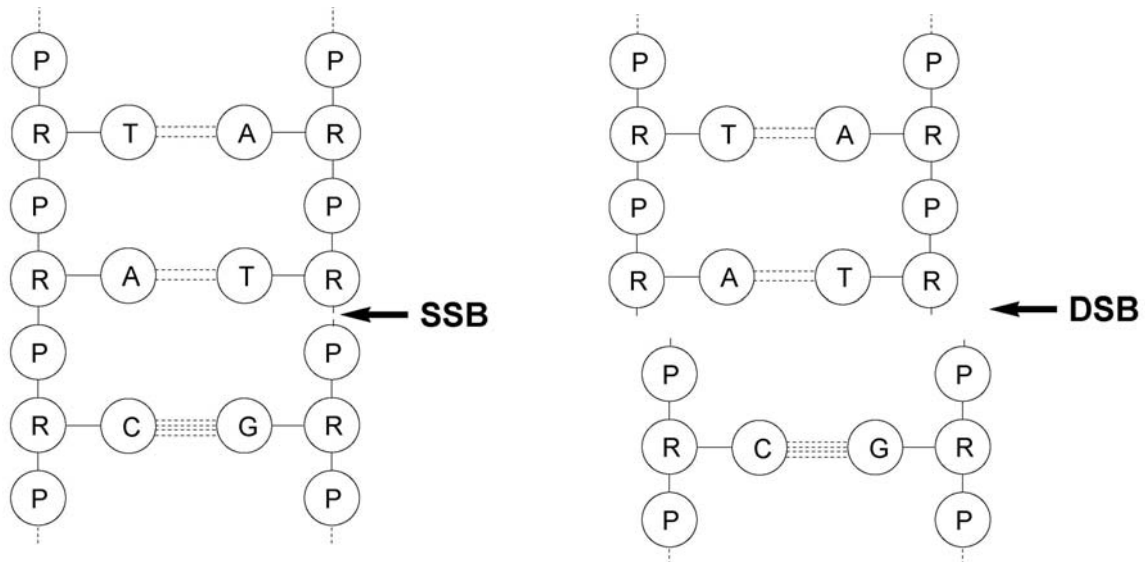


Abbildung 4.63: Unterschied zwischen DNA-Einzel-Strangbruch (links) und DNA-Doppel-Strangbruch (rechts). Bei einem DNA-Einzelstrangbruch wird nur in einem der beiden DNA-Stränge die Verknüpfung der Phosphodiester (P) mit den hydrophilen Zuckerresten (R) unterbrochen. Bei einem DNA-Doppelstrangbruch werden dagegen beide Stränge auf gleicher Höhe getrennt. Die hydrophoben Purin- und Pyrimidinbasenpaare Adenin (A) und Thymin (T) bzw. Guanin (G) und Cytosin (C) bleiben dabei jeweils unbeeinflusst.

Kürzlich wurde neben den beiden bekannten Zinkfinger-Motiven F1 und F2 eine dritte Zink-bindende Domäne entdeckt.^[157, 161] Mit Hilfe von Mutagenese-Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese dritte Zink-bindende Domäne im Gegensatz zu den beiden anderen Zinkfinger-Motiven für die DNA-Bindungsaktivität, die die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung auslöst, nicht essentiell ist. Stattdessen nimmt diese neue dritte Zink-bindende Domäne eine Art Vermittlerrolle unter den einzelnen Protein-Domänen ein, die für die PARP-1-Aktivierung wichtig sind. Es wird angenommen, dass diese neue Domäne das DNA-Bindungs-Signal der ersten beiden Zinkfinger-Motive zum katalytischen C-Terminus überträgt, woraufhin das Enzym die katalytisch aktive Form einnimmt. Wie bereits erwähnt wurde, liegt aktives PARP-1 als katalytisches Dimer vor. Daher spielt die Eigenassoziation des Enzyms bei der PARP-1-Aktivierung eine entscheidende Rolle. Röntgenspektroskopische Untersuchungen zeigten eine präzise Verankerung zweier dieser Moleküle unter Bildung

eines molekularen Dreh- und Angelkreuzes, das in Abbildung 4.64 vereinfacht dargestellt ist. Dieses könnte für die dreidimensionale Anordnung der einzelnen PARP-1-Domänen verantwortlich sein.

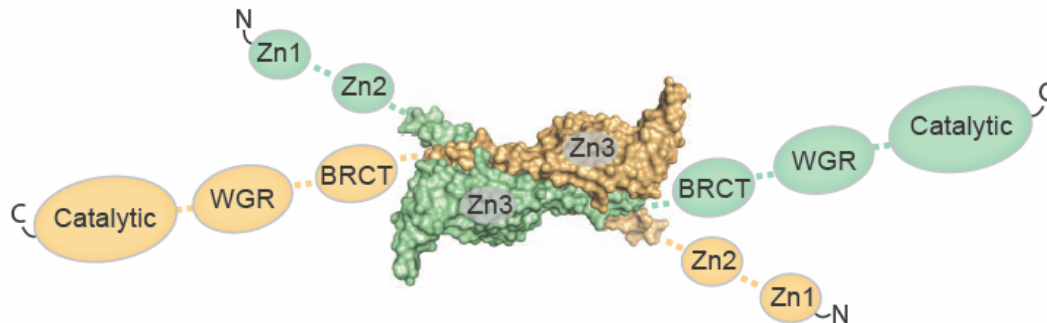


Abbildung 4.64: Röntgenstruktur des Dreh- und Angelkreuzes aus zwei PARP-1-Monomeren.^[161]

In dieser dritten Zink-bindenden Domäne, deren Kristallstruktur in Abbildung 4.65 dargestellt ist, scheint der Aminosäurenrest Lys-249 eine zentrale Rolle zu spielen. Mutationen dieses Aminosäurenrestes führten zu einem vollständigen Funktionsverlust dieser Domäne. Es wird angenommen, dass die Ausbildung der Salzbrücke zwischen Lys-249 und Asp-281 für die Proteinstabilität essentiell ist.

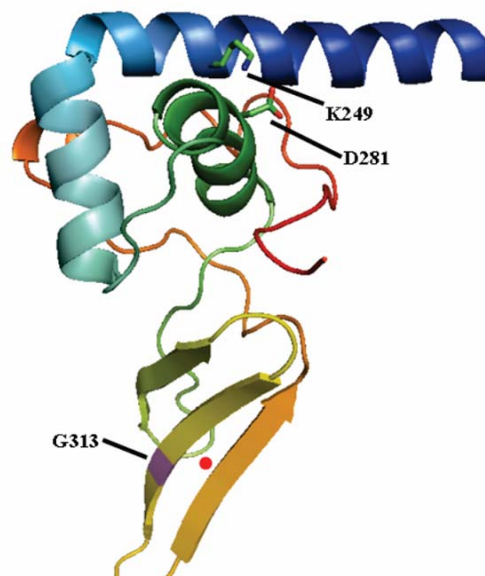


Abbildung 4.65: Röntgenstruktur der dritten Zink-bindenden Domäne mit dem essentiellen basischen Aminosäurenrest Lys-249.^[157]

Die zentrale 22 kDa große Automodifikations Domäne (AMD) enthält 15 Glutaminsäure-Reste. Diese sind an der PARP-1-Automodifikation beteiligt, indem sie als Akzeptor-Bindungsstellen bei der Initiierungsreaktion dienen. Des Weiteren befindet sich in der AMD ein BRCT-Motiv, das starke und spezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen kann, die ebenfalls über BRCT-Motive verfügen. So konnte gezeigt werden, dass das PARP-1-BRCT-Motiv direkt mit der N-terminalen BRCT-Domäne des XRCC1-Proteins oder der DNA-Ligase III wechselwirken kann. Diese Wechselwirkung ist für die Bildung des DNA-Base-Excision-Repair (BER)-spezifischen Protein-Komplexes verantwortlich, wodurch die Bedeutung von PARP-1 an diesem Reparaturweg unterstrichen wird. Ferner wird die AMD auch oft als Steuerelement betrachtet, da sie Domänen für die Dimerisierung enthält, die die Wechselwirkung zwischen PARP-1 mit der DNA und anderen Proteinen regulieren kann.^[147, 159]

Die 55 kDa große katalytische NAD^+ -bindende Domäne befindet sich im C-terminalen Bereich des Enzyms. Die katalytische Aktivität dieser Domäne wird nicht durch DNA-Strangbrüche hervorgerufen, sondern ist allein auf die Synthese der Poly-(ADP-Ribose)-Polymere und deren Bindung an Akzeptorproteine zurückzuführen. In diesem Fragment befindet sich die „Active Site“, die auch oft als PARP-1-Signatur oder *cat*PARP-1 bezeichnet wird. Dieser für die Katalyse essentielle Proteinabschnitt erstreckt sich über die Aminosäuren 859-908 und kann in zwei Bindungsstellen unterteilt werden: die Akzeptor-Bindungsstelle (Adenosin-Bindungsstelle) und die Donor-Bindungsstelle (Nikotinamid-Bindungsstelle). Während die Akzeptor-Bindungsstelle (N-terminal) durch die ADP-Hälfte der Poly-(ADP-Ribose)-Kette besetzt ist, befindet sich in der Donor-Bindungsstelle das Substrat NAD^+ (C-terminal). Diese Donor-Bindungsstelle setzt sich wiederum aus drei Untereinheiten zusammen: der Nikotinamid-Ribose-Bindungsstelle (NI), der Phosphat-Bindungsstelle (PH) und der Adenin-Ribose-Bindungsstelle (AD).^[159, 162] Die „Active Site“ besteht aus einem β - α -loop- β - α -Strukturmotiv, das für die NAD^+ -Bindung verantwortlich ist und bereits in mehreren Mono-(ADP-Ribose) Transferasen nachgewiesen werden konnte. Allerdings unterscheidet sich dieses Motiv völlig von der so genannten „Rossmann Fold“, einem β - β -Motiv, die in Sekundärstrukturen anderer metabolischer NAD^+ -bindender Enzyme, wie z. B. der ADH gefunden wurde. Die katalytische Domäne enthält ferner ein G-reiches Segment, das zwei potentielle Bindungsstellen für Dinukleotide bereitstellt. Dabei handelt es sich um die Aminosäuresequenzen Gly-Lys-Gly und Gly-Lys-Thr. Es wird angenommen, dass die Aminosäurenreste His-862, Lys-893 und Glu-988, die sich in der Donor-Bindungsstelle befinden, für die NAD^+ -Bindung und Katalyse von entscheidender Bedeutung

sind.^[163, 164] Während die Aminosäuren His-862 und Glu-988 Wasserstoffbrücken zum Akzeptor-Nukleophil und zum Donor-NAD⁺ ausbilden, konnte mittels „Site Directed Mutagenesis“-Experimenten gezeigt werden, dass Lys-893 (Gly⁸⁹²Lys⁸⁹³Gly⁸⁹⁴-Motiv) für die Aktivierung der Poly-(ADP-Ribosyl)ierung essentiell ist. Es wird eine direkte Beteiligung von Lys-893 an der Anlagerung des ersten ADP-Ribosyl-Restes von NAD⁺ auf die Akzeptoraminosäure angenommen. Sobald die beiden Zinkfinger-Motive die DNA-Strangbruchstellen detektieren und markieren, kommt es zu einer 500-fachen Erhöhung der basalen Aktivität des katalytischen Zentrums. Es erfolgt die Ausbildung von O-glykosidisch verknüpften Poly-(ADP-Ribose)-Polymeren (PAR). Die Aufklärung der Primärstruktur der Poly-(ADP-Ribose)-Polymere (PAR) zeigte, dass es sich hierbei um ein Homopolymer handelt, wobei bis zu 200 ADP-Ribose-Einheiten miteinander verbunden sind. Die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung lässt sich in drei Reaktionsschritte, die in Abbildung 4.66 dargestellt sind, unterteilen: (1) Initiierung des Substrats NAD⁺, (2) Elongation und (3) Verzweigung der Polymerketten.^[147, 165]

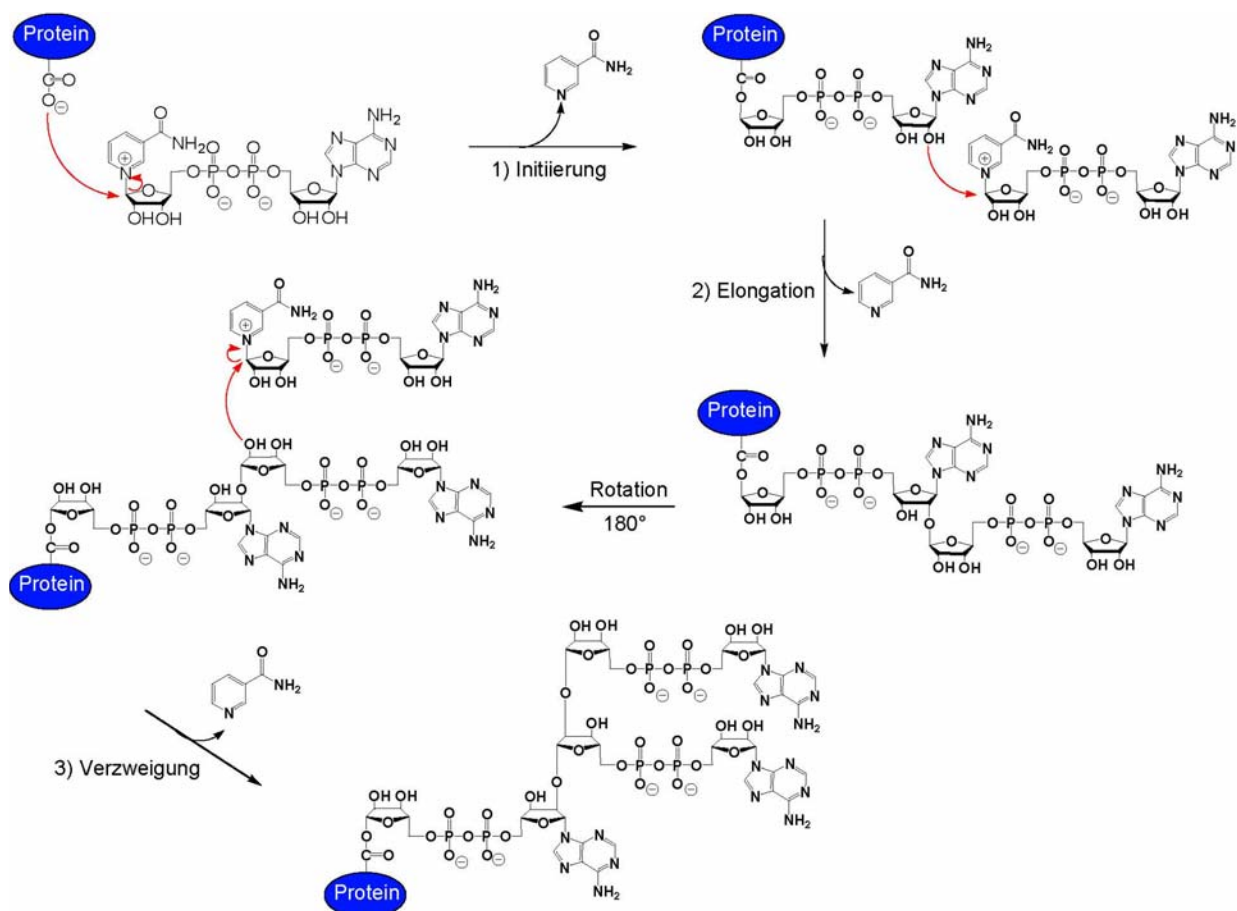


Abbildung 4.66: Allgemeiner Mechanismus der Poly-(ADP-Ribosyl)ierung.

Der Initialschritt beinhaltet sowohl die Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung zwischen der Nikotinamid- und Ribose-Hälfte von NAD^+ , als auch die Bildung einer Esterbindung zwischen der Akzeptoraminosäure des Zielproteins, meistens die Carboxylatgruppe einer Glutamat- oder Aspartatgruppe, und der ADP-Ribose. Anschließend führt die prozessive distale Addition weiterer ADP-Ribose-Einheiten über 1''-2'- α -O-glykosidische bzw. 1''-2''- α -O-glykosidische Bindungen zur fortschreitenden Verlängerung und Verzweigung der Poly-(ADP-Ribose)-Ketten. Es entstehen also kovalente proteingebundene lineare und verzweigte Homo-ADP-Ribose-Polymere. Dabei beträgt das Verhältnis zwischen Verzweigung und Elongation ca. 2 %. Damit die Elongation erfolgen kann, wurde von Ruf *et al.* eine Rotation des Akzeptormoleküls um 180° postuliert.^[165] Durch diese Rotation rückt die Nikotinamidribose-Einheit in die Akzeptorposition und wird anschließend um eine ADP-Ribose-Einheit verlängert. PARP-1 fungiert wegen seiner AMD, die 15 Glutaminsäurereste enthält, als Hauptakzeptor der Poly-(ADP-Ribose)-Polymere. Durch diese Automodifizierung wird PARP-1 inaktiviert. Mit jeder Verlängerung einer ADP-Ribose-Einheit nimmt die negative Ladung des Polymers zu, bis schließlich der Punkt erreicht ist, an dem es zu einer elektrostatischen Abstoßung von PARP-1 mit anderen anionischen Molekülen, wie der DNA kommt.^[147, 154] Durch diese Dissoziation wird den Reparatur-Enzymen der Zugang zur DNA-Bruchstelle geöffnet. Sobald sich PARP-1 von der DNA gelöst hat, werden die Polymere von der Poly-(ADP-Ribose) Glykohydrolase (PARG) hydrolysiert.^[166] Dieser Katabolismus durch PARG trägt dazu bei, dass PARP-1 reaktiviert wird und an einem neuen Zyklus der Automodifikation teilnehmen kann. Der Abbau der Polymere erfolgt nach einem biphasischen Reaktionsmodus. Danach werden langkettige PAR-Moleküle schneller degradiert als kürzere. Je nach Ausmaß der DNA-Schäden kann PARP-1 entweder das Überleben der Zelle fördern, oder den Zelltod induzieren. In Gegenwart geringer DNA-Schäden fördert PARP-1 das Überleben der Zelle, indem es den p53-vermittelten Zellzyklusarrest fördert. Liegen dagegen massive DNA-Schäden vor, kommt es zu einer Überaktivierung von PARP-1 und damit zu einer unkontrollierten Poly-(ADP-Ribosyl)ierung. Die Folge ist eine drastische Abnahme des zellulären Adenintriphosphat- (ATP) und NAD^+ -Speichers, was letztendlich zum nekrotischen Zelltod führt. Abbildung 4.67 zeigt das „Janus-Gesicht“ von PARP-1.^[159, 167, 168] Die oxidierte Form des Pyridinnukleotids NAD^+ nimmt eine essentielle Rolle im Energiemetabolismus ein. Sowohl die Synthese von ATP, als auch die Balance des Redoxpotentials hängen unmittelbar mit dem NAD^+ -Gehalt innerhalb der Zellen zusammen. In unbeschädigten Zellen beträgt die NAD^+ -Konzentration ca. 400-500 μM . Werden die Zellen dagegen DNA-schädigenden endogenen oder exogenen Einflüssen ausgesetzt, dann

nimmt die NAD^+ -Konzentration innerhalb von 5 bis 15 Minuten um ca. 80% vom normalen Wert ab. Diese Reduktion des NAD^+ -Gehaltes führt gleichzeitig zu einer Abnahme von ATP, da für die Resynthese von einem Molekül NAD^+ mindestens zwei Moleküle ATP benötigt werden. Des Weiteren wird durch die NAD^+ -Abnahme die enzymatische Aktivität der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) blockiert, so dass die glykolytische Substratkettenphosphorylierung unterdrückt wird. Wenn es nun möglich wäre, die PARP-1-Aktivität während eines DNA-Schadens zu inhibieren, dann würde es zu keiner weiteren Dezimierung der NAD^+ - und ATP-Konzentrationen kommen. In diesem Fall bliebe der zelluläre Energiespeicher erhalten, und es würde Apoptose statt Nekrose erfolgen.

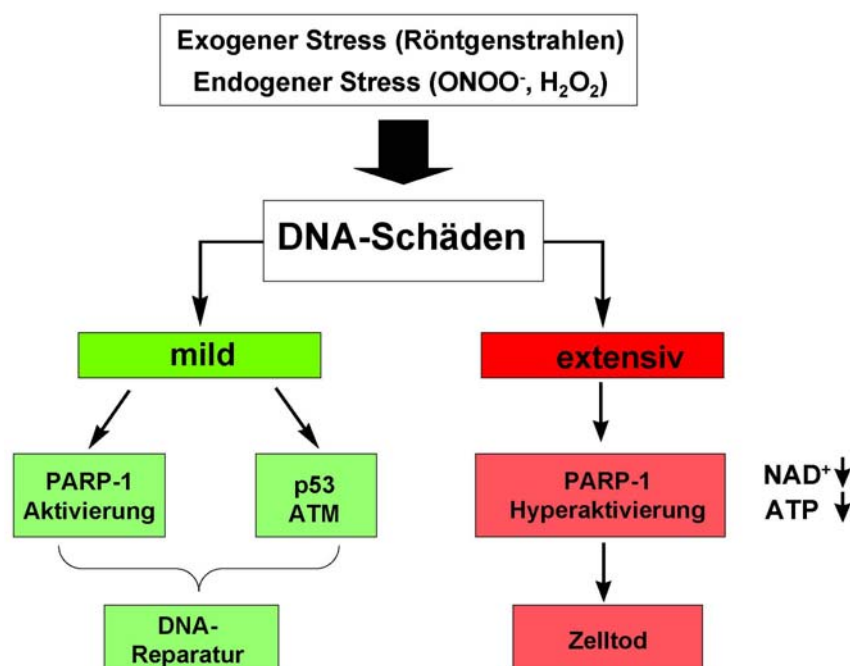


Abbildung 4.67: „Janus-Gesicht“ von PARP-1.

Unter Apoptose versteht man ein biochemisch kontrolliertes Selbstmordprogramm der Zelle, den so genannten programmierten Zelltod.^[13] Das Wort Apoptose stammt aus dem Griechischen und beschreibt den Fall der Blätter im Herbst (apo = ab, ptosis = Senkung). Der apoptotische Prozess verläuft unter ATP-Verbrauch und lässt sich in drei Hauptabschnitte unterteilen, die Initiation, den Effektor und die Exekution. In der Anfangsphase schrumpfen der Zellkern, das Cytoplasma und die Mitochondrien der apoptotischen Zellen. Dabei bleibt die Zellmembran vollständig intakt, so dass keine Entzündungsreaktionen hervorgerufen werden. Wegen des abnehmenden Zellvolumens verliert die Zelle ihren Kontakt zu den Nachbarzellen und tritt in die so genannte Zeiose ein. Damit bezeichnet man die Phase, in der

sich das Chromatin verdichtet und schließlich zerstückelt wird. Die Caspasen sind Cystein-Proteasen, die zelluläre Proteine im letzten Schritt der Apoptose verdauen. Die wichtigsten Substrate der Caspasen sind dabei die Pro-Caspasen-3 und -7. Während der Exekutions-Phase der Apoptose erkennt der Caspase-3,-6,-7-Komplex das DEVD-Motiv in der NLS von PARP-1, und spaltet das Enzym in die beiden Fragmente p89 und p24. Dadurch wird die DBD von der CD getrennt, was gleichzeitig zur Inaktivierung von PARP-1 führt. Die Spaltung von PARP-1 soll verhindern, dass das Enzym durch fragmentierte DNA aktiviert wird, so dass die zelluläre Energie für bestimmte ATP-empfindliche Apoptose-Schritte erhalten bleibt. Damit der Apoptose-Prozess reibungslos funktionieren kann, ist eine Blockierung der PARP-1-Aktivität unerlässlich, um so den energetischen Zustand der Zelle aufrechtzuerhalten.

Im Gegensatz zur Apoptose tritt bei der Nekrose eine Schädigung der Zellmembran ein, so dass das Zellinnere ausläuft. Dadurch werden Entzündungsreaktionen hervorgerufen, die zur Schädigung benachbarter Zellen und Organe führen.^[13, 169]

PARP-1-Inhibitoren

Die Pathogenese vieler Krankheiten ist auf eine Überaktivierung von PARP-1 zurückzuführen. Dazu zählen Schock, Diabetis, Allergien und zahlreiche Entzündungsprozesse. PARP-1-Inhibitoren sind daher seit mehreren Jahrzehnten von großem klinischem Interesse.^[159, 162, 170, 171] Indem PARP-1-Inhibitoren onkologische Therapien unterstützen stellt PARP-1 ein potentiell Zielmolekül für Antitumor-Medikamente dar. Ein allgemeiner Nachteil der Krebs-Chemotherapie beruht vor allem auf der Medikamenten-Resistenz von Tumorzellen. Diese Resistenz ist oft auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Dazu zählen abnehmende Medikamenten-Akkumulation, intrazelluläre Medikamenten-Entgiftung, erhöhte DNA-Reparatur-Toleranz sowie ein fehlerhafter apoptotischer Reaktionsweg. Außerdem können besonders resistente Tumorzellen entweder über genetische Änderungen der Caspase verfügen, oder endogene Caspase-Inhibitoren beinhalten, die den apoptotischen Zelltod-Reaktionsweg meiden. Krebszellen mit niedrigem zellulärem ATP-Niveau können äußerst apoptoseresistent sein, indem sie nicht genügend metabolische Energie für die Apoptose bereitstellen. In diesem Fall können Antitumor-Medikamente das Zellsterben lediglich durch Nekrose induzieren. Wie bereits erwähnt wurde, lässt sich der nekrotische Zelltod allerdings durch eine Inhibierung von PARP-1 vermeiden. Gleichzeitig führt die Inhibierung von

PARP-1 zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber DNA-schädigenden Antitumor-Medikamenten, sowie γ - und Röntgenstrahlen. Daher wird oft der synergistische zytotoxische Effekt der PARP-1-Inhibitoren in Kombination mit γ -Strahlung oder DNA-bindenden Medikamenten ausgenutzt, um die Apoptoseresistenz der Krebszellen zu umgehen. Innerhalb der letzten beiden Jahrzehnte wurden zahlreiche PARP-1-Inhibitoren entwickelt. Als Grundlage dienten dabei die aus der Kristallstruktur der katalytischen Domäne von PARP-1 gewonnenen Erkenntnisse.^[165, 172, 173] Die meisten dieser PARP-1-Inhibitoren sind daher Substrat-Mimetika, die die Substrat-Enzym-Wechselwirkungen zwischen NAD^+ und PARP-1 nachahmen. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum Substrat, fungieren diese Verbindungen als kompetitive Inhibitoren und blockieren dem Substrat NAD^+ den Zugang zur katalytischen Domäne des Enzyms. Es resultiert kompetitive Inhibition der enzymatischen Aktivität. In Abbildung 4.68 sind die drei wichtigsten strukturellen Merkmale aufgeführt, die es bei der Entwicklung neuer potenter PARP-1-Inhibitoren unbedingt beachten werden sollten.^[159, 174] Zu diesen zählen:

- Ein elektronenreiches aromatisches Ringsystem, das über eine Carboxamid-Gruppe mit mindestens einem freien Wasserstoff-Atom am Amid-Stickstoff-Atom verfügt.
- Eine nicht absplaltbare Bindung in der Position 3 bzgl. der Carboxamid-Gruppe
- Die Fixierung der ansonsten frei rotierenden Carboxamid-Gruppe. Auf diese Weise soll die zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit kritischen Aminosäurenresten in der NAD^+ -Bindungsstelle erforderliche Konfiguration gewährleistet werden.

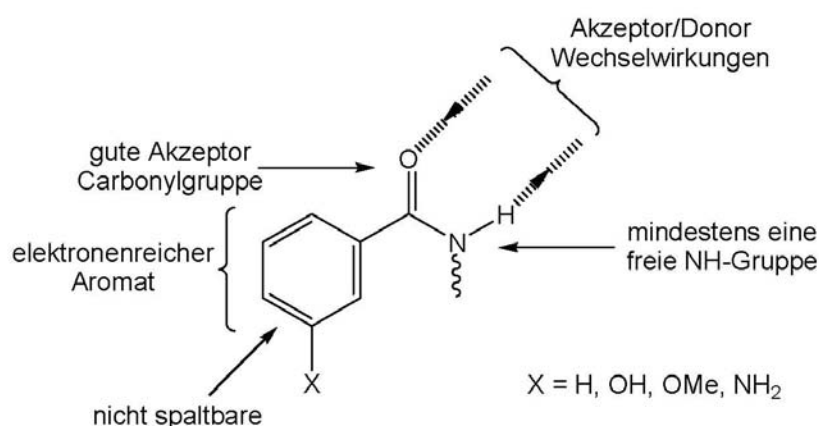


Abbildung 4.68: Essentielle strukturelle Merkmale, die bei der Synthese neuer potenter PARP-1-Inhibitoren unbedingt zu beachten sind.^[159]

Basierend auf diesen Kenntnissen, konnten bereits zahlreiche potente PARP-1-Inhibitoren entwickelt werden, deren inhibitorische Effizienz etwa 1000mal höher ist als die der anfänglichen Benzamid-Derivate.^[175] Dabei konnten unter anderem Inhibitoren entwickelt werden, die eine hohe Selektivität gegenüber PARP-1 und PARP-2 aufweisen.^[176-179] Eine andere Inhibitor-Klasse zeichnet sich dagegen durch eine selektive Oxidation des F1-Zinkfingers aus. Dessen Oxidation führt zur Freisetzung des koordinativen Zink-Ions und damit zur Inhibition von PARP-1. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um C-Nitroso-Derivate. Einer der wichtigsten Vertreter dieser PARP-1-Inhibitor-Klasse ist die in Abbildung 4.69 dargestellte Verbindung 4-Iodo-3-Nitrobenzamid (INO2BA), die kürzlich unter anderem zur Behandlung von Krebs und AIDS untersucht wurde.^[159, 180-182]

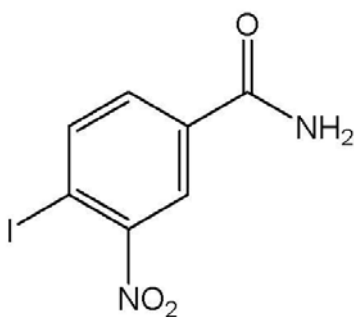


Abbildung 4.69: Strukturformel des potenten PARP-1-Inhibitors INO2BA.

Die Fixierung der Carboxamid-Gruppe scheint bei der Entwicklung der meisten potenten PARP-1-Inhibitoren von essentieller Bedeutung zu sein. Wie klinische Studien ergaben, können viele dieser entwickelten Inhibitoren die therapeutische Wirksamkeit mehrerer bereits in der Onkologie eingesetzter Chemotherapeutika deutlich erhöhen.^[170] PARP-1-Inhibitoren übernehmen daher eher die Rolle eines Sensibilisators als die eines eigens wirkenden Agens. Ferner weisen diese Verbindungen selbst nur eine geringe Eigentoxizität auf und können problemlos mit anderen Mitteln kombiniert eingesetzt werden. In klinischen Testreihen wird daher nach der besten Kombination von PARP-1-Inhibitoren und den entsprechenden therapeutischen Mitteln gesucht, um die optimale Wirksamkeit erzielen zu können. Bislang sind sechs PARP-1-Inhibitoren bekannt, die es in die klinische Testphase der Onkologie geschafft haben, von denen drei oral verabreicht werden können. Bis es allerdings einer dieser viel versprechenden Inhibitoren zum Einsatz als Medikament schafft, müssen noch zahlreiche Sicherheitsfragen bzgl. Pharmakokinetik (zeitabhängige Untersuchungen), Pharmakodynamik (konzentrationsbedingte Effekte), Toxizität, orale Bioverträglichkeit und Langzeiteffekte der PARP-1-Inhibition geklärt werden.

4.4.2 Enzymkinetische Untersuchungen von PARP-1

Die künstlichen Rezeptormoleküle Clip **622** und Tweezer **750** haben sich bereits als effiziente Inhibitoren für die beiden untersuchten Oxidoreduktasen Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) bewährt.^[108, 137] Beide dieser Dehydrogenasen gehören zu den so genannten Bireaktanten-Modellen.^[84] Ihre enzymatische Aktivität wird sowohl durch den Cofaktor, als auch durch das Substrat bestimmt. In einem letzten Projekt dieser Doktorarbeit sollte gezeigt werden, dass die beiden Inhibitoren auch ein vom Cofaktor NAD(P)⁺-unabhängiges Enzym hemmen können. Dies sollte anhand der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1) demonstriert werden, das zu den so genannten Monoreaktanten-Modellen zählt. Dieses Enzym benötigt NAD⁺ nicht als Cofaktor, sondern als Substrat. Hinzu kommt, dass PARP-1 schon seit mehreren Jahrzehnten im Focus klinischer Untersuchung steht.^[170] Äußerst effektive PARP-1-Inhibitoren mit IC₅₀-Werten im einstelligen nanomolaren Bereich finden bereits Verwendung in der Onkologie als effektive Antitumormittel. Den meisten bis heute bekannten PARP-1-Inhibitoren ist allerdings gemein, dass ihre inhibitorische Fähigkeit darin begründet liegt, als Substrat-Mimetika zu agieren. Indem sie die Struktur des Substrats NAD⁺ nachahmen besetzen diese PARP-1-Inhibitoren die Nikotinamid-Bindungsstelle in der katalytischen Domäne des Enzyms und induzieren dadurch Inhibition. Clip **622** und Tweezer **750** weisen dagegen keinerlei strukturellen Ähnlichkeiten zu NAD⁺ auf. Für den Fall einer erfolgreichen Inhibition, kann daher ihre Rolle als Substrat-Mimetika ausgeschlossen werden und es würde ein neuer für PARP-1 noch unbekannter Hemm-Mechanismus vorliegen. Analog zur ADH liegt auch hier die Motivation PARP-1 zu untersuchen in der hohen Affinität des Clips **622** gegenüber NAD⁺ begründet. Zunächst wurden die IC₅₀-Werte beider zu untersuchenden Verbindungen Clip **622** und Tweezer **750** bestimmt. Aus diesen sollten sich Hinweise auf ihre Effektivität als potentielle PARP-1-Inhibitoren gewinnen lassen.

4.4.2.1 Bestimmung der IC₅₀-Werte mit Hilfe des käuflichen PARP-1-Assay-Kits der Firma Trevigen®

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte mit Hilfe des käuflichen PARP-1-Assay-Kits „*Universal Colorimetric PARP-1-Assay-Kit with Histone-coated Strip-Wells 96 test*“ der Firma Trevigen®.^[183] Der Vorteil dieses Assay-Kits besteht darin, dass schnell getestet

kolorimetrische Reaktion gestoppt werden, unter Bildung eines gelben Farbstoffes mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm. Im Gegensatz zum blauen Farbstoff zeichnet sich dieser gelbe Farbstoff sowohl durch eine höhere Absorption als auch durch eine höhere Stabilität aus. Seine Farbe bleibt bis zu 1 h lang erhalten. Anhand unterschiedlicher Farbintensitäten lassen sich Rückschlüsse auf die Effektivität der einzelnen Inhibitoren gewinnen. In Abwesenheit der Inhibitoren findet die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung unter Umsetzung großer Mengen an biotinylierten NAD^+ statt. Dies äußert sich später nach Zugabe von Streptavidin-HRP und TACS-Sapphire™ in einer intensiven Blau- bzw. Gelbfärbung. Wird dagegen der PARP-1-Assay in Anwesenheit effektiver Inhibitoren durchgeführt, lässt sich aufgrund der dadurch induzierten Inhibition nur eine geringe Menge an biotinyliertem PAR detektieren. Dies äußert sich in einer deutlichen Abnahme der Farbintensität. Je effektiver also der entsprechende PARP-1-Inhibitor ist, desto schwächer ist die zu beobachtende Farbintensität. Abbildung 4.71 illustriert das grundlegende Prinzip dieses käuflichen PARP-1-Assay-Kits.

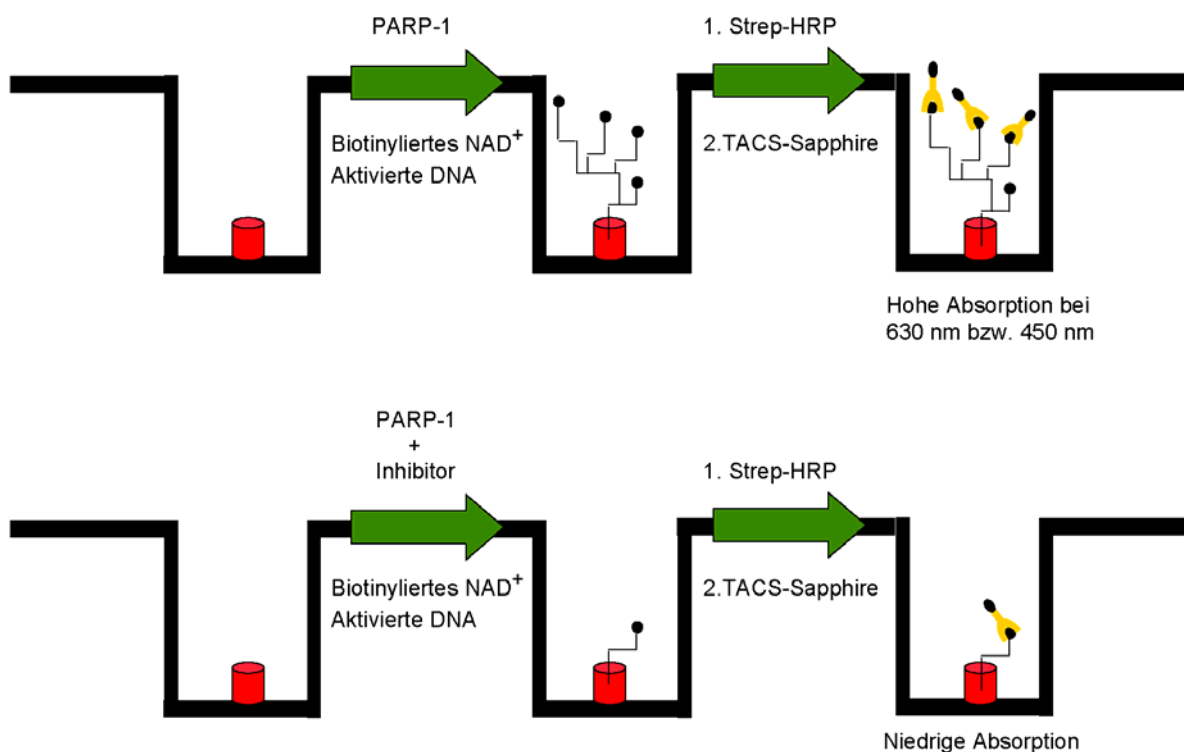


Abbildung 4.71: Vereinfachtes Schema des käuflichen PARP-1-Assay-Kits. Dargestellt ist ein Well der verwendeten 96-Loch-Mikroplatte, dessen Boden mit Histonen (roter Zylinder) ausgekleidet ist. Oben: Nach Zugabe des biotinylierten Substrats (Striche mit Kugeln), aktivierter DNA und PARP-1 findet die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung statt. Anschließend erfolgt die Detektion des von PARP-1 poly-(Ribosyl)ierten Biotins mit Hilfe eines entsprechenden Streptavidin-Detektions-Systems (gelbe Zangen). Die Intensität der resultierenden Absorptionen bei 630 nm bzw. 450 nm liefert Hinweise auf die vorliegende PARP-1-Aktivität und damit auf die Effektivität der eingesetzten Inhibitoren. Unten: In Gegenwart effektiver PARP-1-Inhibitoren ist die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung gehemmt. Es resultiert eine niedrige Absorption.

Der PARP-1-Assay wurde gemäß der Vorschrift von Trevigen® durchgeführt. Als mögliche neue PARP-1-Inhibitoren wurden Clip **622**, Tweezer **750** und der Spacer **422** untersucht. Als Referenz-Inhibitor diente 3-Aminobenzamid (**3-AB**), das im Umfang des PARP-1-Assay-Kits mitgeliefert wurde.^[186] Dieser Referenz-Inhibitor gehört mit einem IC₅₀-Wert von ca. 15 µM zu den mäßig effektiven PARP-1-Inhibitoren.

4.4.2.2 Durchführung des PARP-1-Assay-Kits der Firma Trevigen®

Die Durchführung des PARP-1-Assay-Kits ist im Kapitel 6.3.3.1 beschrieben. In der Tabelle 4.8 sind die Konzentrationen der wichtigsten Komponenten des PARP-1-Assays aufgeführt.

	<i>Einwaage</i>	<i>pH</i>	<i>c(Stammlösung)</i>	<i>c(Assay)</i>
PBS-Puffer	8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na ₂ HPO ₄ , 0.24 g KH ₂ PO ₄ und 1 mL Triton X-100 in 1 L bi-dist. Wasser lösen	7.4		
Biotinyliertes NAD⁺	Bestandteil des PARP-1-Cocktails		unbekannt	
Aktivierte DNA	Bestandteil des PARP-1-Cocktails		unbekannt	
PARP-1	500 U, 10 U/µL, 0.258 mg/mL 7 µL in 2100 µL bi-dist Wasser verdünnen		7.61 nM	2.28 nM

Tabelle 4.8: Zusammensetzung des PARP-1-Assay-Kits der Firma Trevigen®.

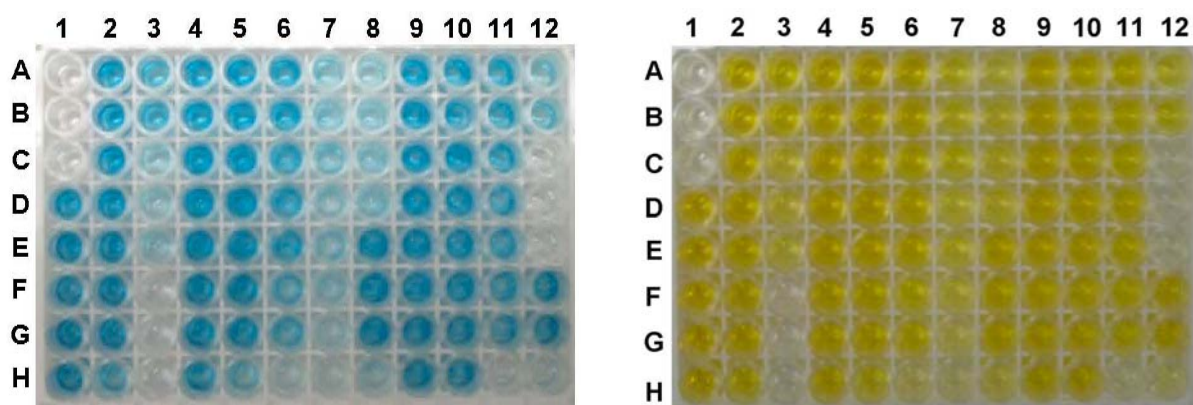


Abbildung 4.72: Fotos der 96-Loch-Mikroplatte. Reihen 1-3 zunehmende Inhibitorkonzentration **3-AB**; Reihen 4-8 zunehmende Inhibitorkonzentration **750**; Reihen 9-12 zunehmende Inhibitorkonzentration **622**; A1-C1: Negativ-Kontrollen; D1-F1, A4-C4, 8E-8G: Aktivitäts-Kontrollen; Links: Absorptionsmaximum bei 630 nm. Rechts: Absorptionsmaximum bei 450 nm nach Zugabe von 0.2 M HCl.

Wie man den beiden in Abbildung 4.72 dargestellten Fotos deutlich entnehmen kann, war die Durchführung des PARP-1-Assays erfolgreich. Die Negativ-Kontrollen (A1-C1) erscheinen wie erwartet farblos, und die Aktivitäts-Kontrollen (D1-F1, A4-C4, E8-G8) weisen eine intensive Blau- bzw. Gelbfärbung auf. Ferner wird die Farbintensität mit zunehmender InhibitorKonzentration immer schwächer. Die am ELISA-Reader gemessenen mOD-Werte wurden anschließend in die prozentuale PARP-1-Aktivität umgerechnet. Eine Auftragung dieser Prozent-Werte gegen die logarithmischen InhibitorKonzentrationen lieferten die entsprechenden IC₅₀-Kurven. Der Schnittpunkt, der sich bei 50% PARP-1-Aktivität mit der jeweiligen sigmoidalen Kurve ergab, entspricht dem IC₅₀-Wert des zugehörigen Inhibitors. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurde insgesamt viermal wiederholt. Für den Analog-Inhibitor 3-Aminobenzamid (**3-AB**) konnte auf diese Weise ein gemittelter IC₅₀-Wert von 30 µM bestimmt werden. Dieser Wert ist doppelt so hoch, wie der von Trevigen® angegebene IC₅₀-Wert von 15 µM. Allerdings konnte in einer anderen Literaturstelle für **3-AB** ein IC₅₀-Wert von 33 µM gefunden werden.^[187] Dieser Wert würde mit dem erhaltenen nahezu perfekt übereinstimmen. Für Clip **622** ergab sich dagegen ein etwa zweimal schlechterer IC₅₀-Wert von 68 µM. Tweezer **750** erweist sich, wie schon zuvor im Fall der Alkohol-Dehydrogenase und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, als der effizienteste Inhibitor. Mit einem IC₅₀-Wert von 3.3 µM inhibiert er PARP-1 etwa zehnmal effektiver als der Analog-Inhibitor **3-AB** und ca. zwanzigmal effektiver als Clip **622**. Für den Spacer **422** konnten im Gegensatz zu den beiden Rezeptoren **622** und **750** keinerlei inhibitorischen Fähigkeiten bzgl. des Enzyms PARP-1 beobachtet werden. Dies war auch zu erwarten gewesen, da der Spacer **422** nicht über die für die Komplexierung benötigten Seitenwände und die daraus resultierenden Kavitäten des Clips bzw. Tweezers verfügt. Eine Inhibition durch den Spacer **422**, wie sie bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zuvor beobachtet werden konnte, ist im Fall von PARP-1 ebenfalls nicht möglich, da PARP-1 über keine definierten Phosphat-Bindungsstellen verfügt. Damit klassifizieren sich beide Rezeptoren Clip **622** und Tweezer **750** als mäßig effektive PARP-1-Inhibitoren. In der Abbildung 4.73 sind die gemittelten IC₅₀-Kurven aller untersuchten PARP-1-Inhibitoren dargestellt.

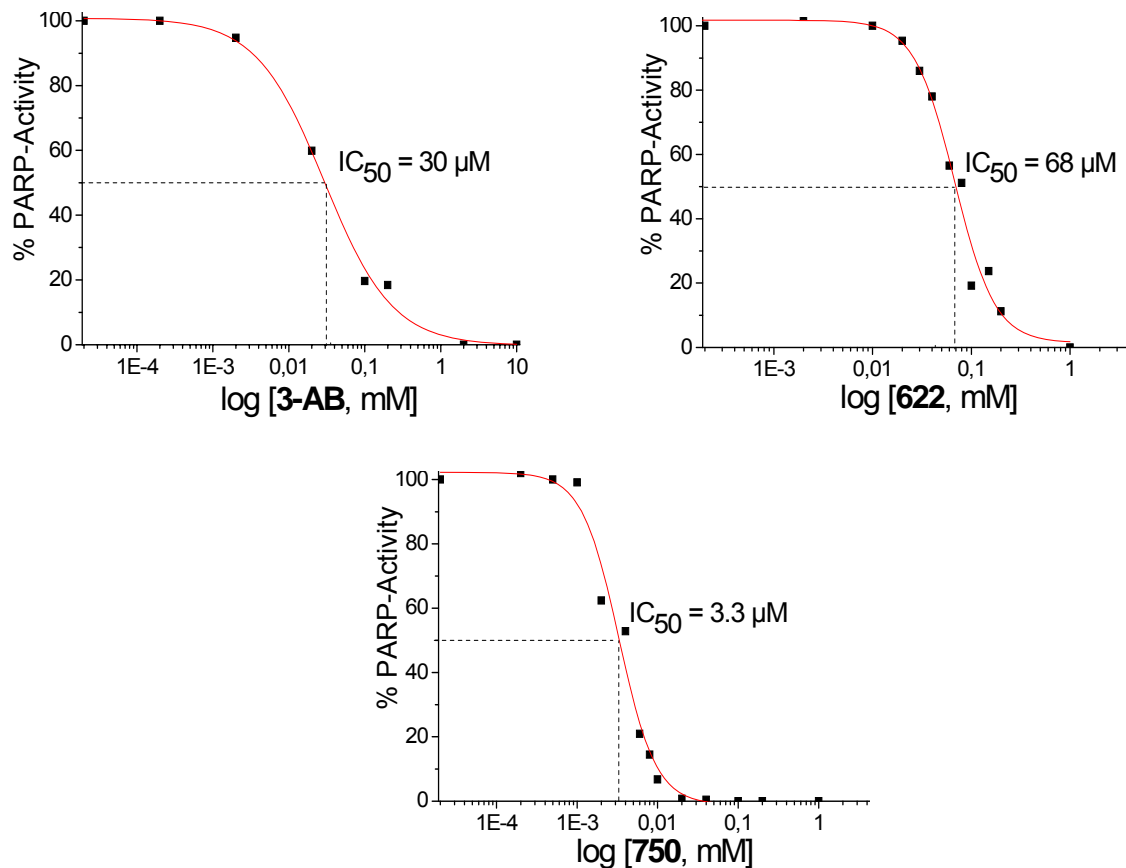


Abbildung 4.73: Übersicht der gemittelten IC_{50} -Kurven aller drei untersuchten Inhibitoren.

Als nächstes sollten die Hemm-Mechanismen beider Inhibitoren aufgeklärt werden. Da sowohl Clip **622**, als auch Tweezer **750** nicht als Substrat-Mimetika fungieren können, muss in ihrem Fall ein für PARP-1 bisher unbekannter Hemm-Mechanismus vorliegen. Denkbar wäre, dass jeder dieser beiden Inhibitoren den Hemm-Mechanismus ausübt, dem diese bereits im Fall der ADH folgten. Demnach würde Clip **622** wieder als NAD^+ -Falle fungieren und Inhibition dadurch herbeiführen, indem er das für die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung erforderliche NAD^+ -Niveau so weit herabsetzt, bis schließlich keine enzymatische Umsetzung mehr möglich ist. Tweezer **750** würde dagegen wieder als Lysin- und Arginin-Rezeptor fungieren und die enzymatische Aktivität durch Komplexierung der auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenreste hemmen. Ob diese postulierten Hemm-Mechanismen für die beiden Inhibitoren zutreffen, wurde mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Plots überprüft. Die dafür erforderlichen kinetischen Untersuchungen ließen sich allerdings mit Hilfe des käuflichen PARP-1-Assay-Kits nicht mehr realisieren. Der ausschlaggebende Grund dafür war, neben den entstehenden zu hohen Kosten, die von Trevigen® nicht

angegebene Konzentration an biotinyliertem NAD^+ im Assay, die zur Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots hätte variiert werden müssen. Daher musste nach einer alternativen Methode gesucht werden, mit der sich die anstehenden kinetischen Untersuchungen der PARP-1-Inhibitoren realisieren ließen.

4.4.2.3 PARP-1-Assay nach Putt und Hergenrother

Der von Putt und Hergenrother entwickelte PARP-1-Assay stellte eine derartige Alternative dar.^[188, 189] Die Messung erfolgte, wie schon zuvor beim käuflichen PARP-1-Assay-Kit, diskontinuierlich. Das Prinzip dieses Assays besteht darin, nicht den biotinylierten Anteil an PAR zu detektieren, sondern den von PARP-1 noch nicht poly-(ADP-ribosyl)ierten Anteil an Substrat NAD^+ mit Hilfe einer chemischen Reaktion in eine hoch fluoreszenzfähige Verbindung zu überführen. Diese lässt sich dann sowohl UV/Vis-spektroskopisch mit einem Absorptionsmaximum bei 378 nm, als auch fluoreszenzspektroskopisch bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission bei 445 nm quantifizieren. Die einzelnen Reaktionsschritte dieses Umwandlungsprozesses sind in der Abbildung 4.74 dargestellt. Dabei erfolgt zunächst die basenkatalysierte Kondensation des Nikotinamidrings des unverbrauchten Substrats NAD^+ mit Acetophenon unter Ausbildung eines Michael-Akzeptors. Nach erfolgter Michael-Addition findet eine Dehydrierung unter Rückgewinnung des aromatischen Systems statt. Diese Rearomatisierung stellt die treibende Kraft dieser Reaktion dar.

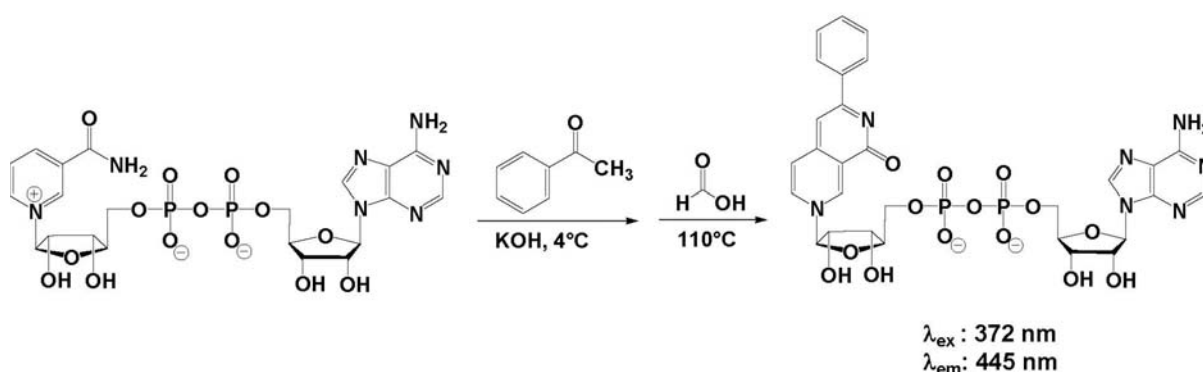


Abbildung 4.74: Allgemeines Prinzip des PARP-1-Assays nach Putt und Hergenrother.

Eine zuverlässige Durchführung des Assays ist allerdings nur unter der Voraussetzung gegeben, dass sich ausschließlich das unverbrauchte NAD^+ und nicht das bei der Poly-(ADP-Ribosyl)ierung abgespaltete Nikotinamid in diesen fluoreszenzfähigen Farbstoff umwandeln

lässt. Laut Literatur ist diese Bedingung erfüllt.^[188] Das Nikotinamid ist unter den im Assay gegebenen Reaktionsbedingungen inert und geht daher keinerlei Reaktion mit Acetophenon ein. Ferner können signifikante Eigenfluoreszenz-Emissionen von NAD^+ und Nikotinamid bei 445 nm ebenfalls ausgeschlossen werden. Die aus den Messungen resultierenden Fluoreszenzintensitäten FI bzw. Extinktionen E wurden anschließend mit den entsprechenden Werten aus den zuvor aufgenommenen NAD^+ -Kalibrierungskurven in Beziehung gesetzt, um so Rückschlüsse auf die Effektivität des jeweiligen Inhibitors gewinnen zu können. Da die chemische Umwandlung des Substrats in die fluoreszenzfähige Verbindung eine Temperatur von 110 °C erfordert, musste zunächst nach einer 96-Loch-Mikroplatte gesucht werden, die dieser extremen Bedingung standhielt. Es zeigte sich, dass nur Platten aus Polypropylen und nicht aus Polyethylen für diese hohen Temperaturen geeignet waren.

Bevor mit den kinetischen Untersuchungen begonnen wurde, sollte allerdings zuerst überprüft werden, ob sich auch mit dieser neuen Methode nach Putt und Hergentrother vergleichbare IC_{50} -Werte für die beiden Rezeptoren Clip **622** und Tweezer **750** ermitteln ließen. Im Gegensatz zu dem käuflichen PARP-1-Assay-Kit von Trevigen[®], bei dem der fertige Assay schon mitgeliefert wurde, musste in diesem Fall der Assay zunächst neu etabliert werden. Dazu wurden die in der von Putt und Hergentrother beschriebenen Literatur für den Assay benötigten Reagenzien von den gleichen Anbietern bezogen. Sowohl PARP-1, als auch aktivierte DNA wurden bei Trevigen[®] bestellt. Acetophenon und der Analog-Inhibitor Benzamid (**BA**) wurden bei Sigma Aldrich[®] gekauft.^[190, 191] Alle für den Assay benötigten Lösungen wurden entweder frisch angesetzt, oder in Dunkelheit bei RT maximal drei Wochen lang aufbewahrt. Der Tris-Puffer bestand aus 50 mM Tris und 2 mM MgCl_2 bei einem pH-Wert von 8.0. Da die DNA-Konzentration von Trevigen[®] auf dem Datenblatt nicht mit angegeben war, musste diese UV/Vis-spektroskopisch bestimmt werden.

4.4.2.4 UV/Vis-spektroskopische Bestimmung der DNA-Konzentration

Dazu wurde die aktivierte DNA 1:10 mit Tris-Puffer verdünnt und in einer Quarz-Küvette bei einer Anregung von 260 nm vermessen. Wie man der Abbildung 4.75 entnehmen kann, weist der Tris-Puffer selbst bei 260 nm eine Extinktion von 0.88 auf. Dieser Extinktionswert muss daher von dem der DNA ($E = 1.82$) subtrahiert werden. Damit ergibt sich eine Extinktion von ca. 1.0. Laut Literatur weist eine 50 $\mu\text{g/mL}$ DNA-Lösung bei 260 nm eine Extinktion E von 1 auf. Die gemessene Extinktion stimmt also mit der für den PARP-1-Assay benötigten DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ überein.

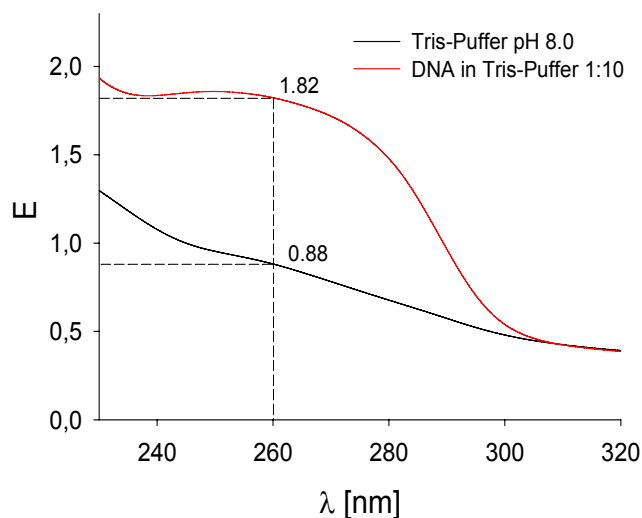


Abbildung 4.75: UV/Vis-spektroskopische Bestimmung der DNA-Konzentration.

4.4.2.5 Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte, deren Durchführung in Kapitel 6.3.3.2 beschrieben ist, wurde mehrmals wiederholt. In der Tabelle 4.9 sind die Konzentrationen der einzelnen Komponenten im PARP-1-Assay nach Putt und Hergenrother zusammengefasst.

	<i>Einwaage</i>	<i>pH</i>	<i>c(Stammlösung)</i>	<i>c(Assay)</i>
Tris-Puffer	3.64 g Trizma Base, 0.244 g MgCl ₂ in 600 mL bi-dist. Wasser lösen (0.1 N HCl)	8.0		
2M KOH	5.6 g in 50 mL bi-dist Wasser			
Acetophenon/ Ethanol (1:4)	20 mL Acetophenon und 80 mL Ethanol p.a.			
NAD⁺			250 nM	100 nM
aktivierte DNA	200-500 Basenpaare		50 µg/mL (165-415 nM)	10 µg/mL (33-83 nM)
PARP-1	1000 U , 10 U/µL, 0.104 mg/mL		10 µg/mL (88.5 nM)	2 µg/mL (17.7 nM)

Tabelle 4.9: Konzentrationen der einzelnen Komponenten im PARP-1-Assay nach Putt und Hergenrother.

Wie man der Tabelle 4.10 und der Abbildung 4.76 entnehmen kann stimmen die mit beiden Methoden gemittelten IC₅₀-Werte der Rezeptoren **622** und **750** recht gut überein. Für den Tweezer **750** ergibt sich nach der Methode von Trevigen[®] ein gemittelter IC₅₀-Wert von

3.3 μM und nach der Methode von Putt und Hergenrother einer von 4.2 μM . Auch für den Clip **622** können mit beiden Methoden annähernd gleiche IC_{50} -Werte bestimmt werden. Nach der ersten Methode beträgt dieser 68 μM und nach der zweiten Methode 58 μM . Gleiches gilt auch für die beiden Analog-Inhibitoren Benzamid (**BA**) und 3-Aminobenzamid (**3-AB**). Obwohl mit beiden Methoden unterschiedliche Analog-Inhibitoren untersucht wurden, weichen die erhaltenen IC_{50} -Werte in beiden Fällen kaum von den Literaturwerten ab. Für den Analog-Inhibitor 3-Aminobenzamid (**3-AB**) ergibt sich nach der ersten Methode ein IC_{50} -Wert von 30 μM , der mit dem Literaturwert von 33 μM recht gut übereinstimmt.^[187] Der nach der zweiten Methode ermittelte IC_{50} -Wert des Analog-Inhibitors Benzamid (**BA**) ist sogar mit dem des Literaturwerts von 1.4 μM identisch.^[188]

Rezeptoren	IC_{50} -Werte [μM]			
	MW Trevigen®	MW Putt und Hergenrother	MW gesamt	Literatur-Werte
3-AB	30		30	33 ^[187]
BA		1.4	1.4	1.444 ^[188]
Clip 622	68	58	63	
Tweezer 750	3.3	4.2	3.8	

Tabelle 4.10: Übersicht der gemittelten IC_{50} -Werte aller vier untersuchten Inhibitoren nach der ersten und zweiten Methode, sowie der dazugehörigen Literaturwerte.

Da beide Bestimmungs-Methoden zuverlässige IC_{50} -Werte im Fall der Analog-Inhibitoren liefern, darf aus den beiden für Clip **622** und Tweezer **750** erhaltenen IC_{50} -Werten der Mittelwert gebildet werden. Diese repräsentieren jeweils den zuverlässigsten IC_{50} -Wert für beide Inhibitoren. Für Clip **622** ergibt sich damit ein IC_{50} -Wert von 63 μM und für Tweezer **750** einer von 3.8 μM .

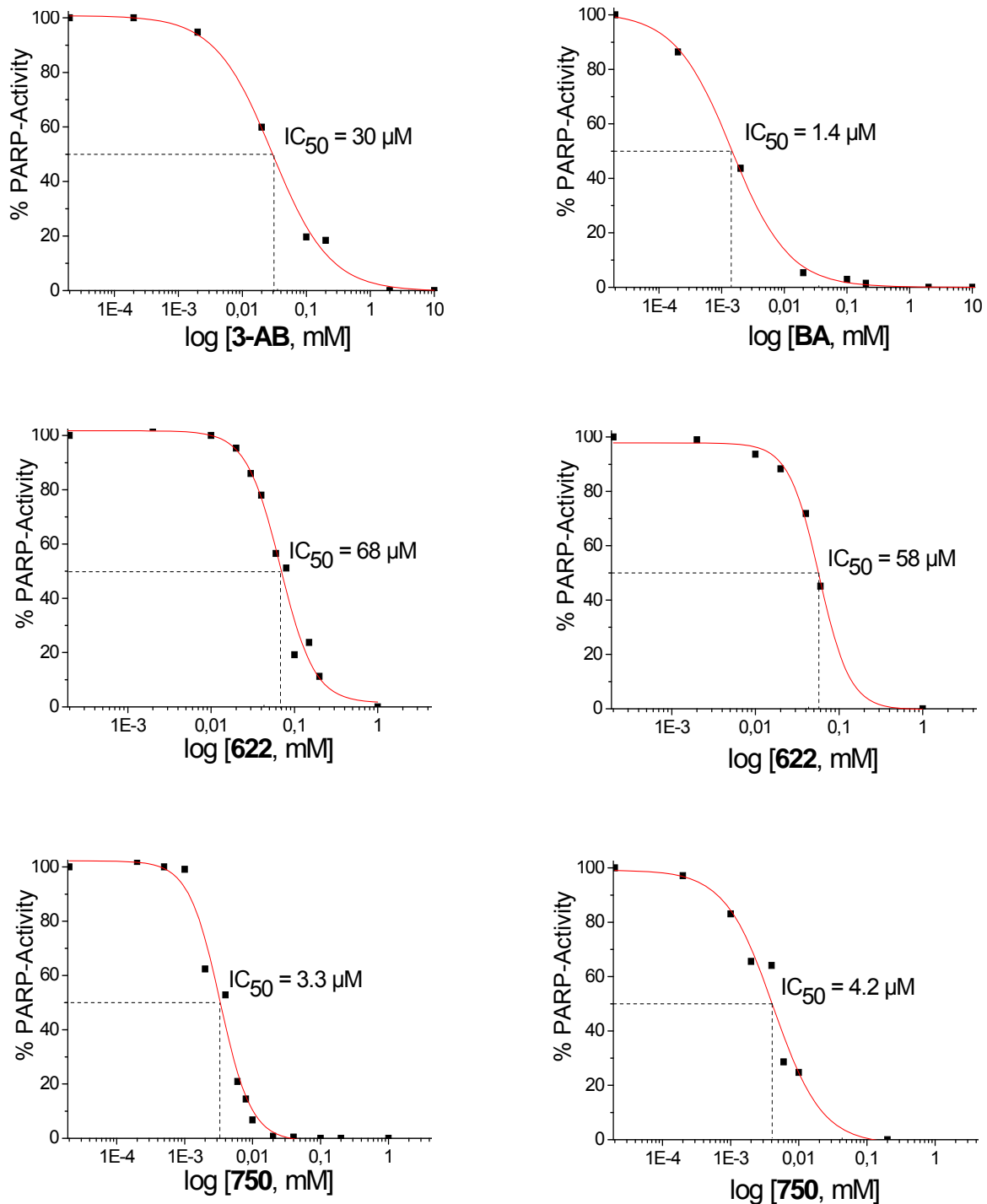


Abbildung 4.76: Gegenüberstellung der gemittelten IC_{50} -Kurven aller untersuchten PARP-1-Inhibitoren nach der Methode von Trevigen® (linke Seite) und der von Putt und Hergenrother (rechte Seite).

Als nächstes wurden die Lineweaver-Burk-Plots bestimmt. Da PARP-1 im Gegensatz zur ADH und G6PD zu den Monoreaktanten-Modellen zählt, ist die Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots auf das Substrat NAD^+ beschränkt. Bevor allerdings mit den

kinetischen Untersuchungen begonnen werden konnte, musste zunächst noch geklärt werden, ob die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung während der gesamten Inkubationszeit von 15 Minuten linear verläuft. Falls dies nicht der Fall gewesen wäre, hätte bei der niedrigsten eingesetzten NAD^+ -Konzentration kontrolliert werden müssen, bis zu welchem Zeitpunkt lineare Poly-(ADP-Ribosyl)ierung gewährleistet wird. Unter diesen Bedingungen hätte die Reaktion zur Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots auch nur bis zu diesem Zeitpunkt laufen dürfen, bevor sie gestoppt worden wäre. Laut Literatur ist der Assay so ausgelegt, dass die PARP-1-Reaktion innerhalb der Inkubationszeit von 15 Minuten nur 8-15% voranschreitet, um eine konstante Anfangsgeschwindigkeit zu gewährleisten.^[188] Um diesen linearen Verlauf der enzymatischen PARP-1-Aktivität zu überprüfen, wurde der normale PARP-1-Assay in Abwesenheit der Inhibitoren bei konstanter NAD^+ -Konzentration (100 nM) zeitabhängig durchgeführt. Dabei wurde die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung über einen Zeitraum von 15 Minuten alle 3 Minuten unterbrochen. Die Endkonzentrationen betrugen 40 nM NAD^+ , 2 $\mu\text{g/mL}$ PARP-1 und 10 $\mu\text{g/mL}$ DNA. Die Anfangs- NAD^+ -Konzentration, die dem Zeitpunkt 0 s entspricht, also dem Zeitpunkt, zu dem noch keine Poly-(ADP-Ribosyl)ierung erfolgt, wurde durch Zusammenpipettieren von 20 μL NAD^+ (100 nM), 20 μL Puffer und 10 μL DNA (10 $\mu\text{g/mL}$) ermittelt. Die Bestimmung des Nullwerts auf diese Weise ist erlaubt, da PARP-1, wie in einem vorherigen Experiment gezeigt werden konnte, über keine Eigenfluoreszenz verfügt. Der Abbruch der Poly(ADP-Ribosyl)ierung zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte durch die allgemeine Aufarbeitung.

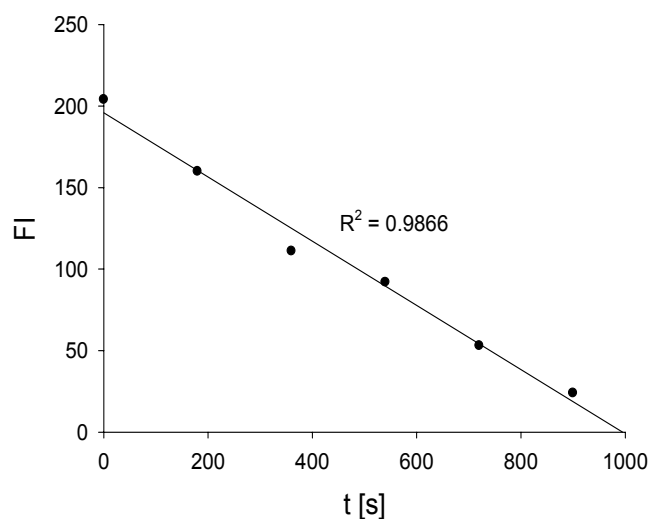


Abbildung 4.77: Überprüfung des linearen Verlaufs der Poly-(ADP-Ribosyl)ierungs-Reaktion.

Wie man der Abbildung 4.77 entnehmen kann, liegt eine lineare Kinetik vor, so dass zur Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots die allgemeine Assay-Vorschrift mit einer Inkubationszeit von 15 Minuten verwendet werden darf.

Zur Auswertung der Lineweaver-Burk-Plots, deren Methode in Abbildung 4.78 detailliert dargestellt ist, werden neben den sich aus dem Assay ergebenden FI-Werten noch die FI-Werte aus der zuvor mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmten NAD^+ -Kalibrierungskurve benötigt. Mit Hilfe dieser NAD^+ -Kalibrierungskurve lassen sich nun die FI-Werte der jeweiligen im Assay verwendeten NAD^+ -Konzentrationen ablesen, die dem Zeitpunkt 0 s entsprechen. Diese FI-Werte sind deswegen von so großem Interesse, da diese zur Bestimmung der Geschwindigkeit v benötigt werden. Die Differenz, die sich durch Subtraktion der erhaltenen Assay-FI-Werte bei der jeweiligen NAD^+ -Konzentration von den FI-Werten der NAD^+ -Kalibrierungskurve bei der gleichen NAD^+ -Konzentration ergibt, entspricht ΔFI . Dieser ΔFI -Wert, in Gegenwart oder in Abwesenheit der Inhibitoren (native), dividiert durch die Inkubationszeit von 15 Minuten bzw. 900 s ergibt die Geschwindigkeit v . Die reziproke Auftragung der Geschwindigkeit $1/v$ gegen die NAD^+ -Konzentration $1/[\text{NAD}^+]$ lieferte folglich die gewünschten Lineweaver-Burk-Plots.

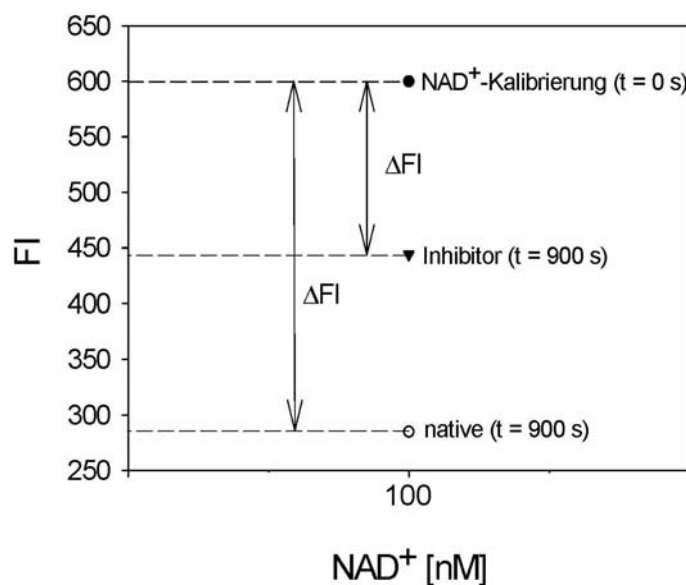


Abbildung 4.78: Auswertung der Lineweaver-Burk-Plots mit Hilfe der Bestimmung der ΔFI -Werte.

4.4.2.6 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der NAD⁺-Kalibrierungskurve

Die Abbildung 4.79 links zeigt eine NAD⁺-Kalibrierungskurve. Da für die kinetischen Untersuchungen der PARP-1-Inhibitoren eine höhere NAD⁺-Konzentration als 100 nM benötigt wurde, musste eine weitere NAD⁺-Kalibrierungskurve mittels Fluoreszenz aufgenommen werden. Dazu wurden NAD⁺-Konzentrationen bis zu 1 µM berücksichtigt. Die entsprechende NAD⁺-Kalibrierungskurve ist in der Abbildung 4.79 rechts dargestellt.

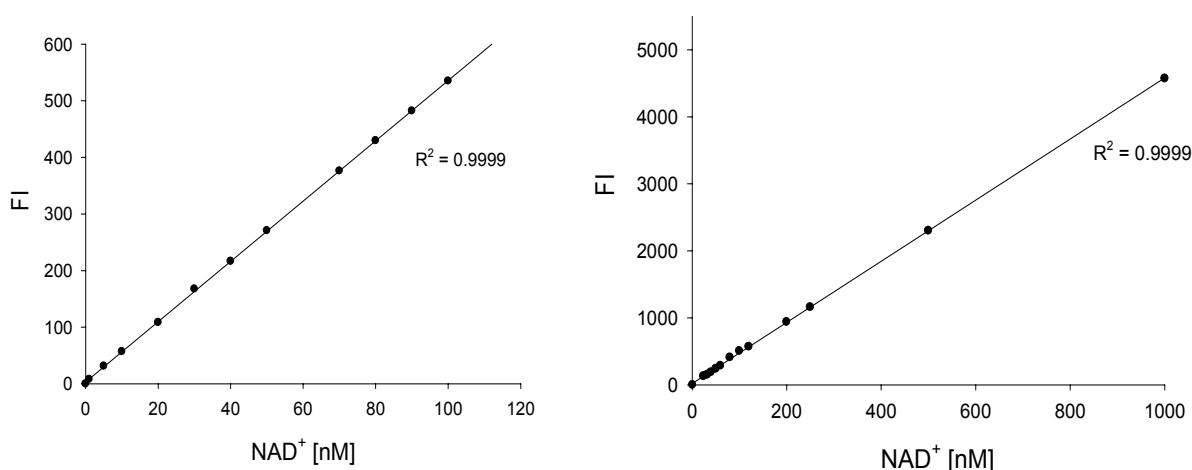


Abbildung 4.79: Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der NAD⁺-Kalibrierungskurve. Links: Konzentrationsbereich bis 100 nM; Rechts: Konzentrationsbereich bis 1 µM.

4.4.2.7 Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots

Die Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots wurde mehrmals wiederholt. Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der aus allen Messwerten gemittelten reziproken Geschwindigkeiten v gegen die unterschiedlichen reziproken NAD⁺-Konzentrationen. In Abbildung 4.80 sind die Lineweaver-Burk-Plots aller untersuchten Inhibitoren dargestellt. Für den Analog-Inhibitor **BA** ergibt sich ein kompetitiver Hemm-Mechanismus. Der Analog-Inhibitor **BA** konkurriert also mit dem Substrat NAD⁺ um die Nikotinamid-Bindungsstelle in der katalytischen Domäne von PARP-1. Indem **BA** als Substrat-Mimetika fungiert, blockiert es den Zugang des NAD⁺ zur „Active Site“ und induziert dadurch PARP-1-Inhibition. Im Fall des Tweezers **750** liegt dagegen ein nichtkompetitiver Hemm-Mechanismus vor. Demnach konkurriert der Tweezer **750** nicht um die Substrat-Bindungsstelle, sondern induziert Inhibition durch Komplexierung einiger auf der Proteinoberfläche befindlicher kritischer

basischer Aminosäurenreste. Dieser Hemm-Mechanismus des Tweezers **750** konnte bereits für die ADH eindeutig nachgewiesen werden. Wie bereits zuvor erwähnt wurde stellen insbesondere die beiden Lysin- und Arginin-reichen Zinkfinger-Motive F1 und F2 bevorzugte Angriffspunkte für den Tweezer dar. Auch für Clip **622** scheint der zuvor postulierte Hemm-Mechanismus zuzutreffen. Die Lineweaver-Burk-Plots ergeben für den Clip **622** wieder einen kompetitiven Hemm-Mechanismus. Demnach fungiert Clip **622** auch hier als NAD^+ -Falle, indem es das für die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung essentielle Substrat komplexiert. Dadurch könnte das NAD^+ -Niveau wieder so weit unter die kritische Grenze herabgesetzt werden, bis schließlich keine enzymatische PARP-1-Aktivität mehr möglich ist.

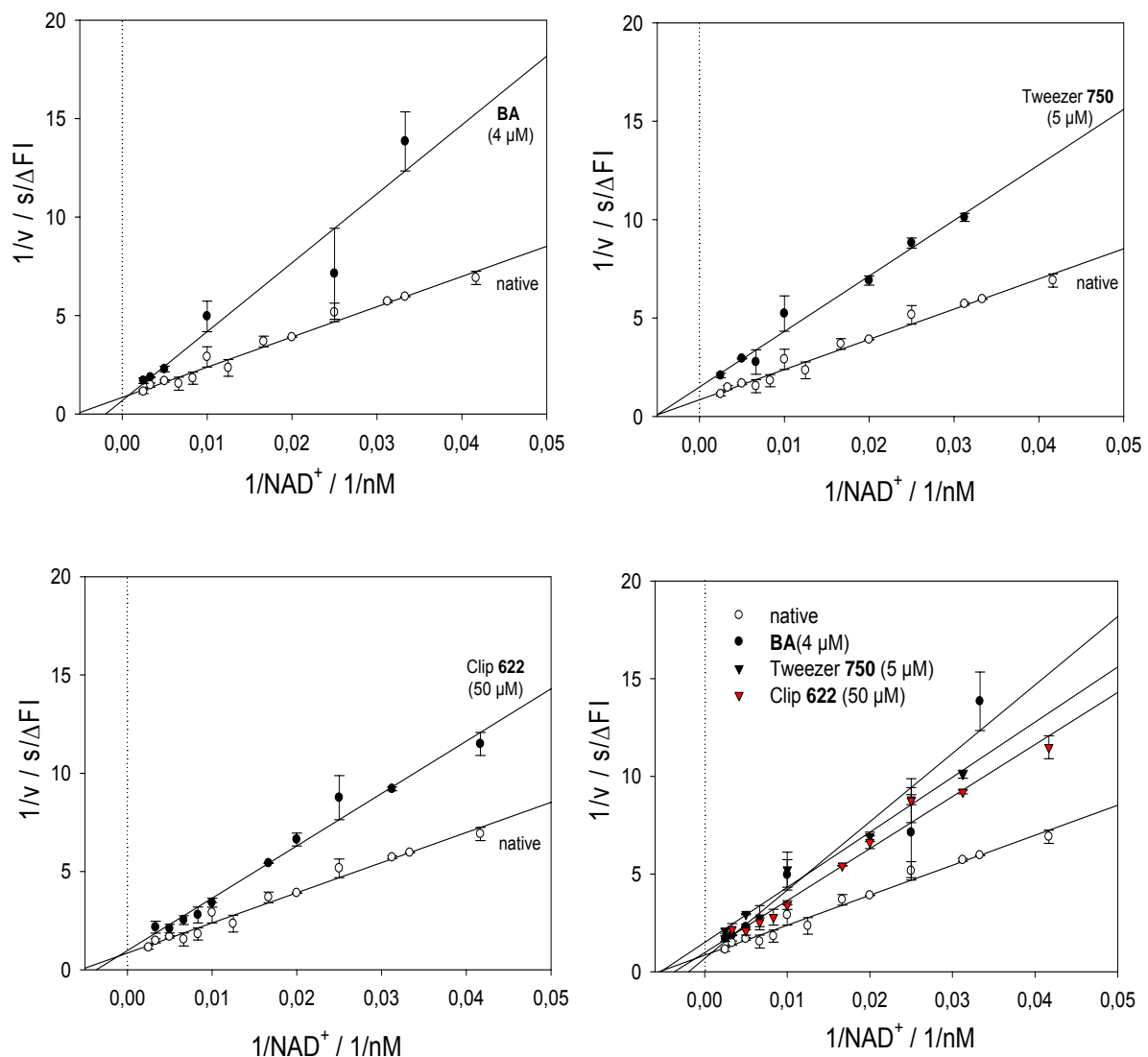


Abbildung 4.80: Übersicht der gemittelten Lineweaver-Burk-Plots der drei untersuchten Inhibitoren.

Nach der Aufklärung der Hemm-Mechanismen beider Inhibitoren wurden Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente durchgeführt. Da im Fall des Tweezers **750** ein nichtkompetitiver und im Fall des Clips **622** ein kompetitiver Hemm-Mechanismus vorliegt, sollte sich nach vorausgegangener vollständiger Inhibition durch Zugabe geeigneter Konkurrenz-Moleküle die enzymatische Aktivität wieder zurückgewinnen lassen. Dies konnte bereits zuvor für die ADH und G6PD erfolgreich demonstriert werden. Für den Tweezer wurde hierfür wieder das geschützte Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe als Gastmolekül eingesetzt.

4.4.2.8 Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente

Die Durchführung der einzelnen Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente ist in dem Kapitel 6.3.3.5 beschrieben.

4.4.2.8.1 Einfluss der Komponenten Tweezer 750 und Ac-Lys-OMe

In der Tabelle 4.11 sind die gemittelten prozentualen Reaktivierungswerte bei den unterschiedlichen Gast-Molekül-Konzentrationen zusammengefasst.

Ac-Lys-OMe [μM]	50	120	250	480	960
eq bzgl. 750	2.5	6	12	24	48
Reaktivierung [%]	18.6	35.3	48.0	70.6	80.5

Tabelle 4.11: Übersicht der gemittelten prozentualen Reaktivierungswerte.

Das Diagramm 4.2 visualisiert die prozentuale Reaktivierung von PARP-1 nach Zugabe des Konkurrenz-Moleküls Ac-Lys-OMe bei unterschiedlichen Konzentrationen. Daraus geht hervor, dass sich die PARP-1-Aktivität nach vorausgegangener vollständiger Inhibition durch Zugabe von Ac-Lys-OMe bis zu ca. 80% wieder reaktivieren lässt. Allerdings ist dazu ein recht großer Überschuss an Gast-Molekülen erforderlich. Während im Fall der Alkohol-Dehydrogenase lediglich 3 eq Ac-Lys-OMe gegenüber Tweezer **750** benötigt werden, um 40% der ursprünglichen Enzymaktivität nach vorausgegangener vollständiger Inhibition

wieder zu erlangen, werden hier für den selben Effekt mehr als sechs Äquivalente benötigt. Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass der Tweezer stärker an die PARP-1-Proteinoberfläche bindet, als im Fall der ADH.

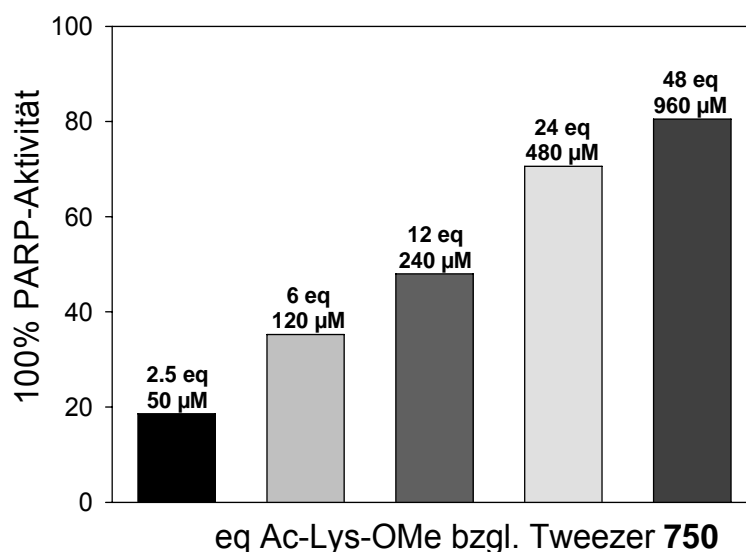


Diagramm 4.2: Übersicht der gemittelten prozentualen Reaktivierungswerte bei Zugabe des Konkurrenz-Moleküls Ac-Lys-OMe.

In diesem Zusammenhang sollte ferner überprüft werden, ob sich die enzymatische Aktivität nach vorausgegangener Inhibition vielleicht auch durch einen Überschuss an DNA wieder zurückgewinnen lässt. Bei einem positiven Befund, wäre dies ein erster Hinweis auf den potentiellen Angriffsort des Tweezers, die DNA-bindende Domäne, insbesondere die beiden Zinkfinger-Motive F1 und F2.

4.4.2.8.2 Einfluss der Komponenten Tweezer 750 und DNA

Die gemittelten prozentualen Reaktivierungswerte sind in der Tabelle 4.12 zusammengefasst.

DNA [μ g/mL]	1 (10-facher Überschuss)	10 (100-facher Überschuss)
Reaktivierung [%]	37.1	48.3

Tabelle 4.12: Übersicht der gemittelten prozentualen Reaktivierungswerte.

Das Diagramm 4.3 visualisiert die prozentuale Reaktivierung von PARP-1 nach Zugabe eines Überschusses an DNA. Daraus geht hervor, dass sich die PARP-1-Aktivität nach vorausgegangener Inhibition durch Zugabe eines 10-fachen Überschusses gegenüber der im Assay bereits vorliegenden DNA-Konzentration bis zu ca. 40% und durch Zugabe eines 100-fachen Überschusses bis zu etwa 50% wieder anschalten lässt. Dies unterstützt das Postulat, dass die inhibitorische Effizienz des Tweezers **750** wahrscheinlich in der Besetzung der beiden Zinkfinger-Motive begründet liegt.

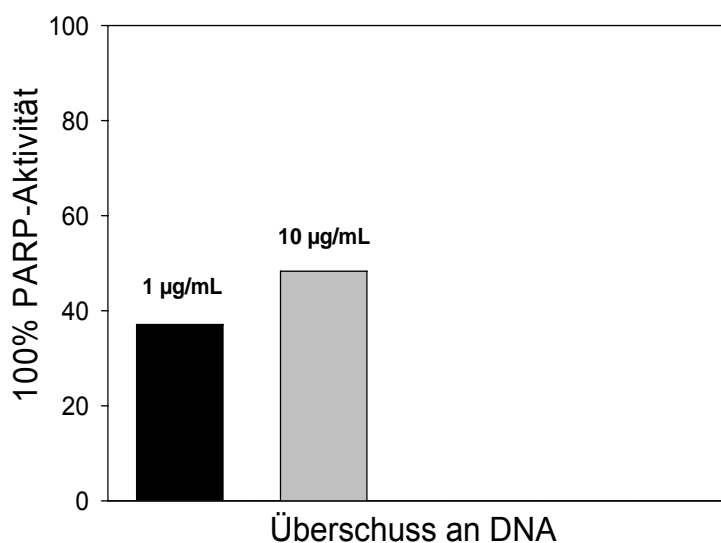


Diagramm 4.3: Übersicht der gemittelten prozentualen Reaktivierungswerte in Gegenwart überschüssiger DNA.

Auf ein Inhibitions- und Reaktivierungsexperiment nach vorausgegangener vollständiger Inhibition durch den Clip **622** durch Zugabe von überschüssigem Substrat NAD^+ , wie es im Fall der ADH erfolgreich demonstriert werden konnte, wurde hier verzichtet. Selbst wenn die PARP-1-Aktivität durch das überschüssige NAD^+ wieder angeschaltet werden würde, ließe sich dieser Effekt aufgrund der stark zunehmenden Fluoreszenzintensität durch das zusätzliche Substrat nicht feststellen. Aus dem gleichen Grund war auch *N*-Methylnikotinamidiodid (NMNA) als Gast-Molekül für eine Reaktivierung der ursprünglichen enzymatischen Aktivität ungeeignet. Wie alle *N*-Alkylpyridinium-Verbindungen wird auch *N*-Methylnikotinamidiodid (NMNA) in Gegenwart eines Ketons und überschüssiger Säure beim Erhitzen in eine fluoreszenzfähige Verbindung überführt.^[188] Es konnte nachgewiesen werden, dass NMNA im Vergleich zu NAD^+ bei gleicher Konzentration (100 nM) eine bis zu fünfmal höhere Fluoreszenzintensität aufweist. Dagegen sollte sich 2'-Deoxycytidin unter den gegebenen Bedingungen inert verhalten und damit als Gast-Molekül geeignet sein. Die entsprechenden Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

4.4.2.8.3 Einfluss der Komponenten Clip 622 und 2'-Deoxycytidin

Die Tabelle 4.13 enthält die gemittelten prozentualen Reaktivierungswerte.

2'-Deoxycytidin [μM]	500	1000	2000
eq bzgl. 750	2.5	5	10
Reaktivierung [%]	17.2	42.0	48.8

Tabelle 4.13: Übersicht der gemittelten prozentualen Reaktivierungswerte.

Das Diagramm 4.4 visualisiert die prozentuale Reaktivierung von PARP-1 nach Zugabe des Konkurrenz-Moleküls DC bei unterschiedlichen Konzentrationen. Daraus geht hervor, dass sich die enzymatische PARP-1-Aktivität nach vorausgegangener vollständiger Inhibition durch den Clip **622** durch Zugabe von zehn Äquivalenten 2'-Deoxycytidin bis zu ca. 50% wieder reaktivieren lässt. Damit stellt 2'-Deoxycytidin für Clip **622** ein gleich gutes Gastmolekül dar, wie Ac-Lys-OMe im Fall des Tweezers **750**. In beiden Fällen wird durch die Zugabe des entsprechenden Gastmoleküls bei gleicher Konzentration ein ähnlicher Rückgewinnungseffekt erzielt.

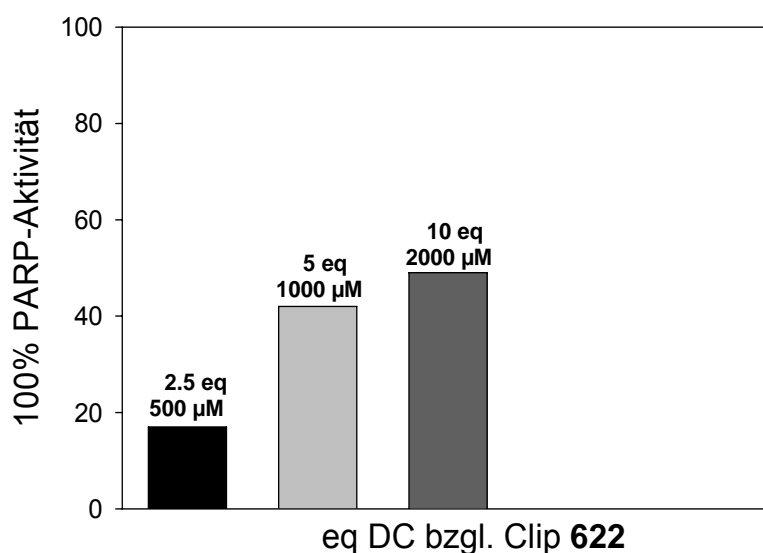


Diagramm 4.4: Übersicht der gemittelten prozentualen Reaktivierungswerte bei Zugabe des Konkurrenz-Moleküls DC.

Als nächstes wurde versucht, die beiden Protein-Inhibitor-Komplexe mittels nicht-denaturierender Gelelektrophorese sichtbar zu machen.

4.4.2.9 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese

Die Durchführung der nicht-denaturierenden Gel-Elektrophorese erfolgte analog zu der der ADH. Wie man der Abbildung 4.81 entnehmen kann, wandern die beiden Inhibitoren in Richtung Anode ((+)-Pol). Für das reine Enzym PARP-1 lässt sich keine Bande erkennen. Vermutlich war die eingesetzte Enzym-Konzentration zu gering. Des Weiteren zeigen die Banden der beiden Protein-Inhibitor-Komplexe zu denen der reinen Inhibitoren ein nahezu ähnliches Laufverhalten. Zu erwarten wäre gewesen, dass die beiden Spots der Protein-Inhibitor-Komplexe aufgrund ihrer Größe langsamer in Richtung Anode wandern, als die wesentlich kleineren freien Inhibitoren. Da dies nicht der Fall ist, kann anhand dieser Spots keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die Komplexe wirklich entstanden sind oder nicht.

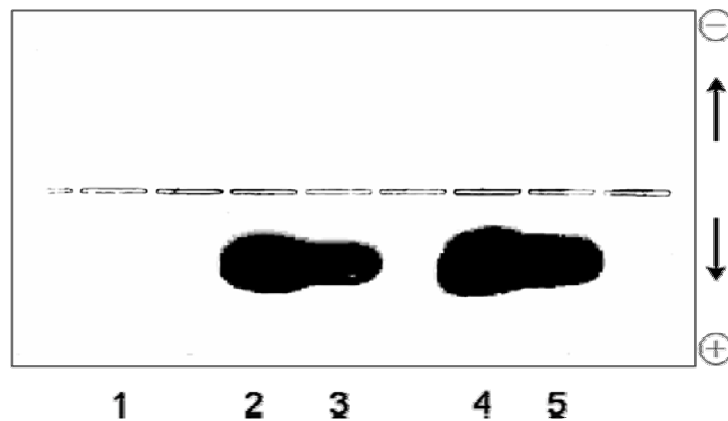


Abbildung 4.81: Nicht-denaturierende Gelelektrophorese der beiden Inhibitoren Tweezer **750** und Clip **622**
1: PARP-1 (2.1 μ M); 2: Tweezer **750** (75 mM); 3: PARP-1 (1 μ M)•Tweezer (35 mM); 4: Clip **622** (70 mM);
5: PARP-1 (1 μ M)•Clip (35 mM). Die Trennzeit betrug hier 1 h.

4.4.2.10 Überprüfung eines synergistischen Effektes durch Kombination eines kompetitiv und nichtkompetitiv wirkenden Inhibitors

Mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Plots konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass sich der Tweezer **750** im Gegensatz zu den meisten bekannten kompetitiv wirkenden PARP-1-Inhibitoren nichtkompetitiv gegenüber dem Substrat NAD^+ verhält. Während für die herkömmlichen PARP-1-Inhibitoren die katalytische Domäne als Angriffspunkt dient, liegt die inhibitorische Effizienz des Tweezers **750** vermutlich in der DNA-bindenden Domäne

begründet. Dafür spricht bereits das zuvor durchgeführte Inhibitions- und Reaktivierungsexperiment in Gegenwart überschüssiger DNA. Aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsweise von Tweezer **750** und den herkömmlichen PARP-1-Inhibitoren könnte bei geeigneter Kombination kompetitiv und nichtkompetitiv wirkender Inhibitoren ein synergistischer Effekt auftreten. Dieser wäre mit einem niedrigeren IC_{50} -Wert für die Mischung verbunden. Um dies zu überprüfen, wurde neben dem Tweezer **750** der Analog-Inhibitor Benzamid (**BA**) eingesetzt. Für beide Inhibitoren konnten bereits nahezu identische IC_{50} -Werte nachgewiesen werden. Wenn nun durch die Kombination beider Inhibitoren ein synergistischer Effekt auftreten sollte, dann müsste der resultierende IC_{50} -Wert deutlich unterhalb von $1\ \mu\text{M}$ liegen. Es wurden die IC_{50} -Werte für die Kombination **BA**/Tweezer **750** in den Verhältnissen 1:1 und 2:1 untersucht. Wie man den in Abbildung 4.82 dargestellten IC_{50} -Kurven entnehmen kann, bestätigt sich der erhoffte synergistische Effekt beider Inhibitoren nicht. Stattdessen kann ein additiver Effekt festgestellt werden.

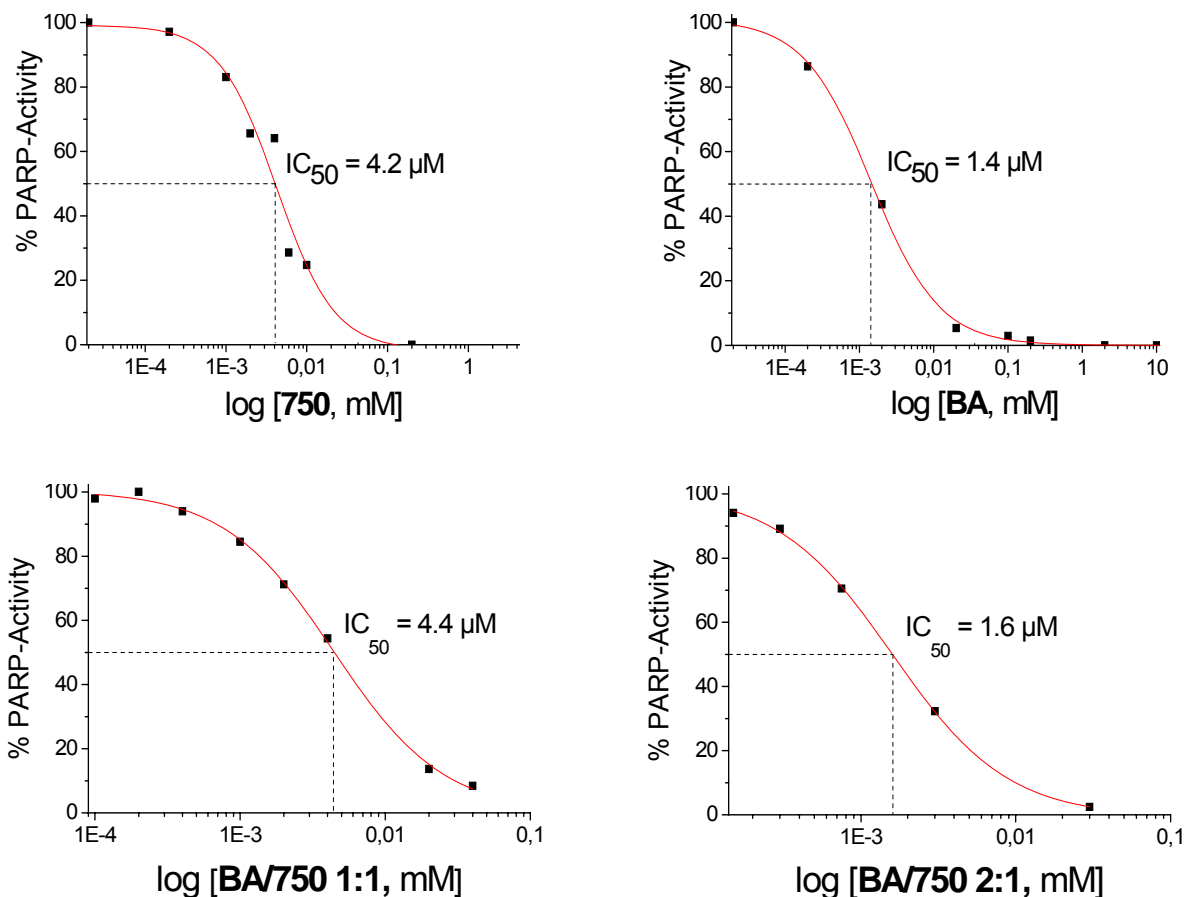


Abbildung 4.82: Gegenüberstellung der gemittelten IC_{50} -Kurven der einzelnen Inhibitoren Tweezer **750** und **BA**, sowie die der Kombination **BA**/Tweezer **750** in den Verhältnissen 1:1 und 2:1.

Bei äquimolaren Konzentrationen von Tweezer **750** und **BA** ergibt sich ein IC_{50} -Wert von $4.4 \mu\text{M}$. Dieser setzt sich aus $2.2 \mu\text{M}$ **BA** und $2.2 \mu\text{M}$ Tweezer **750** zusammen und ist nahezu identisch mit dem des reinen Tweezers **750** von $4.2 \mu\text{M}$. Durch die Kombination beider Inhibitoren wird also nur noch die Hälfte an Tweezer **750** benötigt, um die Enzymreaktion um 50% zu inhibieren. Andererseits wird von Benzamid eine Konzentration von $2.2 \mu\text{M}$ benötigt, die etwas höher liegt, als die des reinen Inhibitors **BA** von $1.4 \mu\text{M}$. Aufgrund der höheren erforderlichen Konzentration an **BA** entsteht zunächst der Eindruck, als würden sich beide Inhibitoren kompetitiv zueinander verhalten und dadurch gegenseitig behindern. Daher wurde mittels Fluoreszenztitration überprüft, ob der Tweezer **750** in der Lage ist mit **BA** einen stabilen Komplex zu bilden. Die Fluoreszenztitration lieferte eine Bindungskonstante K_a von ca. 700 M^{-1} . Aufgrund dieses recht niedrigen K_a -Wertes kann die postulierte Interaktion beider Inhibitoren daher ausgeschlossen werden. Im Vergleich zu den auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenresten stellt Benzamid damit einen viel schlechteren Gast für den Tweezer **750** dar. Das geschützte Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe wird z. B. 70mal stärker komplexiert als Benzamid.

Dass durch die Kombination beider Inhibitoren wirklich ein additiver Effekt auftritt, kann anhand des IC_{50} -Werts von $1.6 \mu\text{M}$, der sich bei der Kombination **BA/750** 2:1 ergibt, bestätigt werden. Dieser Wert setzt sich aus ca. $1 \mu\text{M}$ **BA** und ca. $0.6 \mu\text{M}$ Tweezer **750** zusammen. Auch hier wird also von den einzelnen Inhibitoren jeweils eine geringere Konzentration als im Fall der reinen Inhibitoren benötigt. Demnach addieren sich die inhibitorischen Fähigkeiten beider Inhibitoren.

4.4.2.11 Experimente zur Bestimmung des potentiellen Angriffsorts des Tweezers 750

Nachdem alle kinetischen Untersuchungen abgeschlossen waren, sollten weitere Experimente folgen, die den aus den Inhibitions- und Reaktivierungsexperimenten gewonnen Verdacht der DNA-bindenden Domäne als potentiellen Angriffsort des Tweezers erhärten könnten. Neben den Kristallstrukturen beider Zinkfinger-Motive F1 und F2, wurden in diesem Zusammenhang auch die Kristallstrukturen des dritten Zinkfinger-Motivs sowie die der katalytischen Domäne intensiv analysiert.^[192-194] Dabei wurden alle basischen Aminosäurenreste der einzelnen Domänen, die ein potentielles Ziel für den Tweezer **750** darstellen könnten, farblich markiert, Lysine violett und Arginine blau. Anhand der Anzahl

der basischen Aminosäurenreste und ihrer Zugänglichkeit sollte sich danach abschätzen lassen, in welcher Domäne die inhibitorische Effizienz des Tweezers sehr wahrscheinlich begründet liegt.

Als erstes wurden die drei Zinkfinger-Motive der DBD auf kritische Lysine hin untersucht. Wie bereits zuvor erwähnt wurde, sind diese drei Zinkfinger-Motive in ihrer Funktionsweise nicht gleichwertig. Im Gegensatz zu den beiden ersten Zinkfingern F1 und F2 detektiert der dritte Zinkfinger F3 DNA-Strangbrüche nicht. Stattdessen wird ihm eine kommunikative Rolle bei der Signalübertragung von der DBD zur CD zugesprochen. Aufgrund ihrer essentiellen Funktion als Auslöser bzw. Vermittler der katalytischen Aktivität von PARP-1 wäre es daher denkbar, dass die Komplexierung leicht zugänglicher kritischer Lysine dieser drei Zinkfinger-Motive durch den Tweezer **750** zur Inhibition von PARP-1 führen könnte. Die in Abbildung 4.83 dargestellte Röntgenstruktur des ersten Zinkfingers F1 mit dem PDB-Code 2DMJ weist fünf Lysine auf, deren Komplexierung die Funktion des Zinkfingers empfindlich beeinflussen könnte. Die beiden direkt aufeinander folgenden Lysine Lys-29 und Lys-30 sowie das Lysin Lys-66, die sich in unmittelbarer Umgebung des koordinativen Zink-Zentrums befinden, könnten dabei eine entscheidende Rolle spielen. Denkbar wäre, dass durch deren Komplexierung das koordinative Zink-Ion, das für die Ausrichtung und Stabilität des Zinkfingers essentiell ist, negativ beeinflusst wird und dadurch das Zinkfinger-Motiv α -Helix befinden, könnten zu einer Konformationsänderung beitragen und dadurch die Interaktion des Zinkfingers mit der großen Furche der DN.

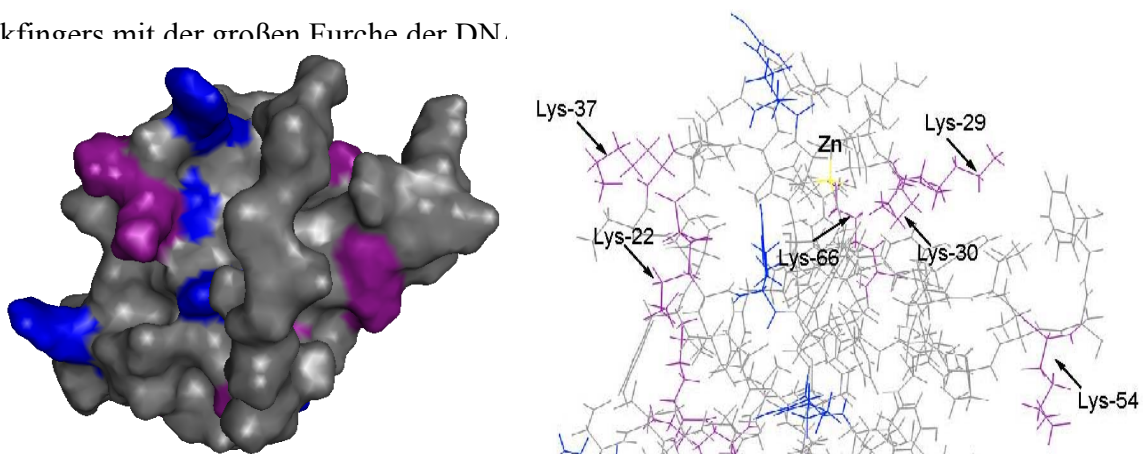


Abbildung 4.83 : Röntgenstruktur des Zinkfinger-Motivs F1 mit dem PDB-Code 2DMJ. Lysine sind violett und Arginine blau gefärbt.

Der nur um zwei Aminosäuren größere Zinkfinger F2 weist insgesamt sieben kritische Lysine auf. Wie man der Abbildung 4.84 entnehmen kann, befindet sich das Lysin Lys-70 in direkter Nachbarschaft zum koordinativen Zink-Ion. Dessen Komplexierung könnte ebenfalls zum vollständigen Funktionsverlust des Zinkfingers beitragen. Auf den ersten Blick scheinen die beiden aufeinander folgenden Lysine Lys-46 und Lys-47 ein weiteres bevorzugtes Ziel für den Tweezer **750** darzustellen. Allerdings sind diese im Vergleich zu den anderen drei Lysinen Lys-36, Lys-39 und Lys-53 deutlich schwerer zugänglich.

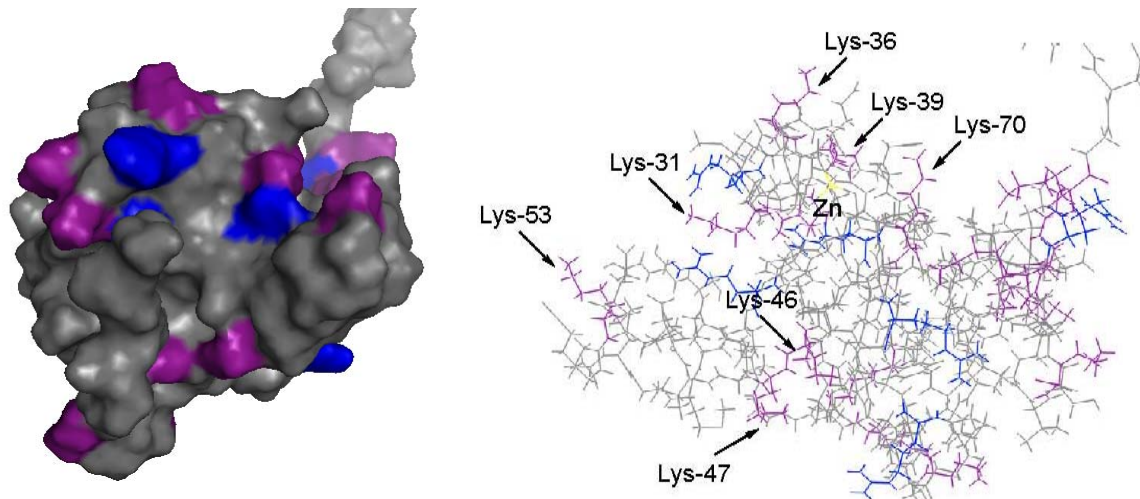


Abbildung 4.84: Röntgenstruktur des Zinkfinger-Motivs F2 mit dem PDB-Code 2CS2. Lysine sind violett und Arginine blau gefärbt.

Laut Literatur befindet sich in der dritten Zink-bindenden Domäne F3 ein kritisches Lysin Lys-249, das mit Aspartat Asp-281 eine Salzbrücke bildet (Abbildung 4.65).^[157, 161] Es wird angenommen, dass dieses für die Proteinstabilität verantwortlich ist. Des Weiteren wird über diese Domäne postuliert, dass sie als Dimer ein molekulares Dreh- und Angelkreuz bildet, über das die dreidimensionale Anordnung der einzelnen PARP-1-Domänen koordiniert wird (Abbildung 4.64). Würde nun der Tweezer **750** die für die Dimerisierung erforderlichen kritischen Lysine komplexieren, dann könnte keine Dimerisierung und folglich keine Signalübertragung von der DBD zur CD stattfinden. Die Folge wäre Inhibition. Gleiches würde bei der Komplexierung des Lysins Lys-249 erfolgen.

Eine weitere mögliche Angriffsfläche für den Tweezer **750** stellt die katalytische Domäne (CD) dar. In dieser Domäne, deren Röntgenstruktur in Abbildung 4.85 dargestellt ist, befindet sich das in der Literatur oft diskutierte kritische Lysin Lys-893. Von diesem wird

angenommen, dass es eine entscheidende Rolle bei der katalytischen Aktivierung von PARP-1 spielt. Mit Hilfe von „Site Directed Mutagenesis“-Experimenten konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass dieser basische Aminosäurenrest direkt am ersten Katalyseschritt, der Übertragung der ersten ADP-Ribose-Einheit auf das Akzeptorprotein, beteiligt ist.^[163, 164] Die Komplexierung dieser Aminosäure durch den Tweezer **750** würde die katalytische Aktivität von PARP-1 verhindern und ebenfalls Inhibition induzieren.

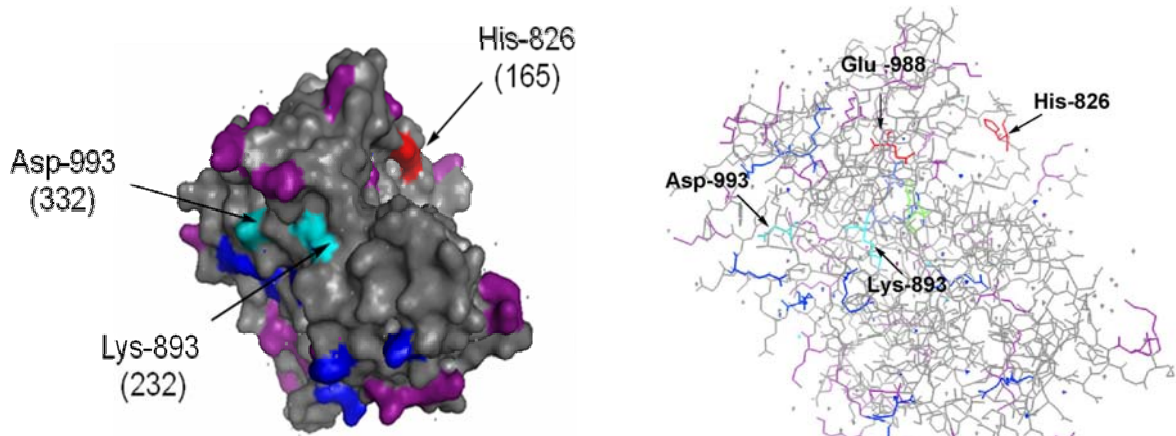


Abbildung 4.85: Röntgenstruktur der katalytischen Domäne mit dem PDB-Code 2RCW. Lysine sind violett und Arginine blau gefärbt. Die für die Substratbindung essentiellen Aminosäuren Glu-988 und His-826 sind rot gefärbt. Die für die Katalyse essentiellen kritischen Aminosäuren Lys-893 und Asp-993 sind türkis gefärbt.

4.4.2.11.1 Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und dem Tweezer 750

Ein Vergleich der Röntgenstrukturen zeigt, dass die beiden Zinkfinger-Motive F1 und F2 in der DNA-bindenden Domäne mit ihren insgesamt 13 kritischen basischen Aminosäurenresten deutlich mehr potentielle Angriffspunkte für den Tweezer **750** bieten als das dritte Zinkfinger-Motiv F3 und die katalytische Domäne mit jeweils einem kritischen Lysin. Daher sollte die inhibitorische Effizienz des Tweezers **750** in der Komplexierung kritischer Lysine in den beiden Zinkfinger-Motiven F1 und F2 begründet liegen. Dies galt es nun experimentell zu belegen. Da sich in beiden Zinkfinger-Motiven jeweils ein koordinatives Zink-Ion befindet sollte als erstes untersucht werden, ob der Tweezer **750** eventuell auch in der Lage sein könnte diese Zink-Ionen über seine beiden negativ geladenen Phosphat-Substituenten zu komplexieren. Wenn dies der Fall wäre, dann könnte durch deren Komplexierung eine Zinkfreisetzung erfolgen. Dadurch käme es zum Struktur- und Funktionsverlust beider

Zinkfinger-Motive und folglich zur Inhibition. Die Affinität des Inhibitors **750** gegenüber Zink-Ionen wurde mit Hilfe der Fluoreszenztitration überprüft.

Wie aus den Fluoreszenzspektren der Abbildungen 6.19 und 6.20 im Experimentellen Teil hervorgeht, scheint der Tweezer **750** Zink-Ionen recht stark zu komplexieren. Während der Titration trat sogar eine zunehmende Trübung der Lösung auf, die auf den ausgefallenen Tweezer-Zink-Ionen-Komplex zurückgeführt werden kann. Durch Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), die bekannter Weise einen sehr starken Komplex mit Zink-Ionen eingeht, konnte wieder eine klare Lösung erhalten werden. Dieser Effekt ließ sich auch fluoreszenzspektroskopisch verfolgen. Wie man der Abbildung 4.86 entnehmen kann, lässt sich durch Zugabe von 10 mM EDTA wieder das ursprüngliche Fluoreszenzspektrum des Tweezers **750** zurückgewinnen.

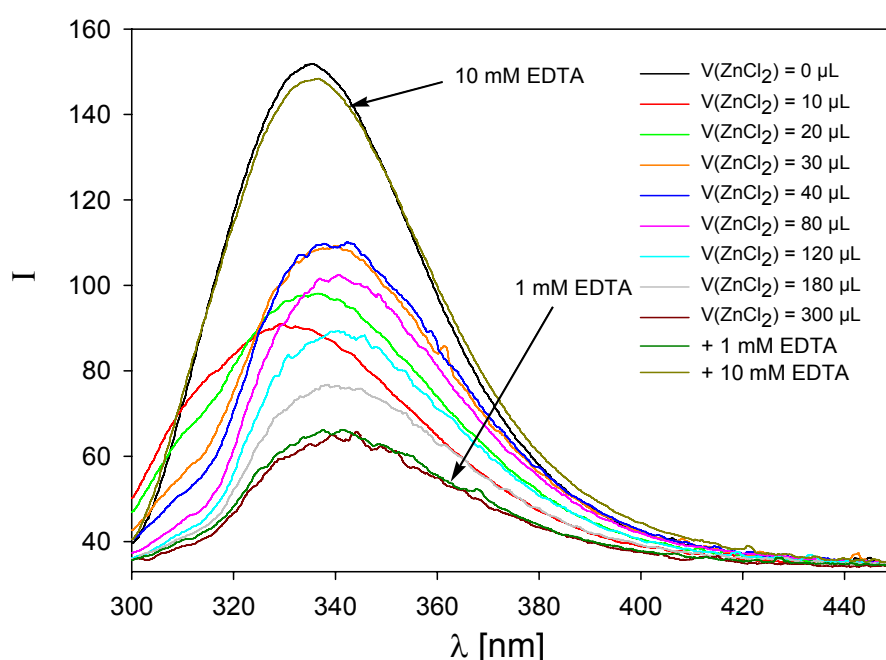


Abbildung 4.86: Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und Tweezer **750** in Tris-Puffer.

Wie man der Titrationskurve in der Abbildung 6.19 des Experimentellen Teils entnehmen kann, liegen zwei Wendepunkte vor. Beide deuten auf unterschiedliche Komplexbildungen hin. Der erste Wendepunkt erfolgt bei ca. fünf Äquivalenten und der zweite bei etwa 30 Äquivalenten Zink-Ionen bzgl. Tweezer **750**. Da sich für diese hohen Zink-Ionen-Konzentrationen aufgrund der Fällung keine Bindungskonstante ermitteln ließ, wurde als

nächstes der Konzentrationsbereich bis sechs Äquivalente betrachtet, beim dem keine Fällung eintrat. (Abbildung 6.18, Experimenteller Teil)

Die ermittelte Bindungskonstante K_a von etwa 200.000 M^{-1} bestätigt den zuvor postulierten starken Komplex zwischen Tweezer **750** und den Zink-Ionen. Bei genauer Betrachtung der Fluoreszenzspektren in Abbildung 4.87 lässt sich ab einem Verhältnis von 1:2 (Tweezer **750**/ Zn^{2+} -Ionen) ein bathochromer Effekt erkennen, der mit zunehmender Zink-Ionen-Konzentration immer ausgeprägter erscheint. Dieser 1:2-Komplex ist auf die beiden Phosphat-Substituenten des Tweezers zurückzuführen, die insgesamt vier negative Ladungen tragen und folglich zwei Zink-Ionen komplexieren können. Bei einer höheren Zink-Ionen Konzentration über zwei Äquivalente hinaus bildet sich vermutlich ein neuer Komplex, dessen Bildung von einem bathochromen Effekt begleitet wird.

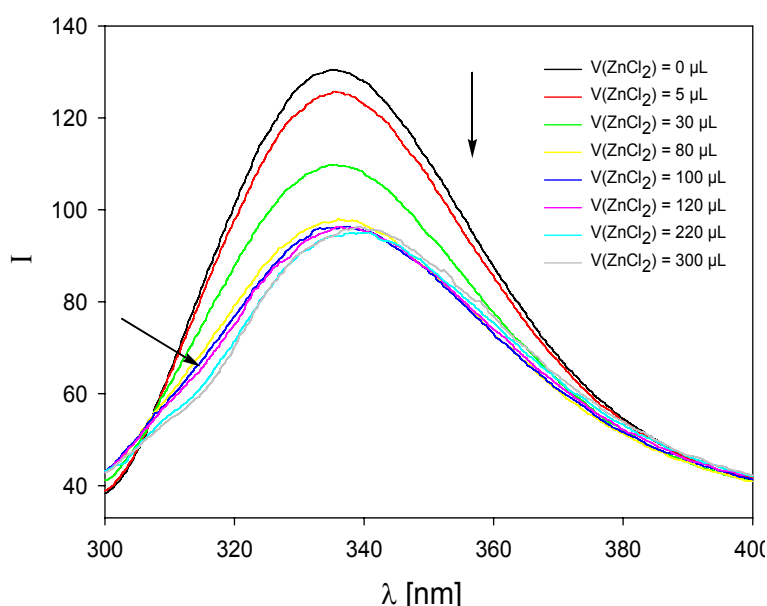


Abbildung 4.87: Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und Tweezer **750** in Tris-Puffer bei sehr geringem Überschuss an Zink-Ionen. Ab einer 1:2 Stöchiometrie (blaue Kurve, linker Pfeil) erfolgt ein bathochromer Effekt. Dieser deutet auf die Bildung eines neuen Komplexes zwischen Tweezer **750** und den Zink-Ionen hin.

Nachdem eindeutig bewiesen werden konnte, dass Tweezer **750** mit Zink-Ionen starke Wechselwirkungen eingeht, sollten in diesem Zusammenhang auch noch Fluoreszenztitrations-Experimente mit den drei Übergangsmetall-Ionen Cu^{2+} , Fe^{2+} und Fe^{3+} sowie den beiden Erdalkalimetall-Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+} und dem Alkalimetall-Ion Cs^+ durchgeführt werden. Zudem sollte überprüft werden, ob sich der Clip **622** gegenüber Metall-Ionen analog dem Tweezer **750** verhält. Die Durchführung der Fluoreszenztitrationsen erfolgte unter gleichen Bedingungen. Die dazugehörigen Fluoreszenzspektren sind den Kapiteln

6.6.2.3 und 6.6.2.4 im „Experimentellen Teil“ zu entnehmen. In der Tabelle 4.14 sind die Bindungskonstanten aller Tweezer-Metall-Ionen-Komplexe und Clip-Metall-Ionen-Komplexe zusammengefasst.

Substrat/Rezeptor		Tweezer 750 K_D [μ M]	Clip 622 K_D [μ M]
Übergangsmetall-Ionen	Zn^{2+}	5	Keine Auswertung möglich
	Fe^{2+}	127	222
	Fe^{3+}	222	-
	Cu^{2+}	526	520
Erdalkalimetall-Ionen	Ca^{2+}	Keine Auswertung möglich	5952
	Mg^{2+}	Keine Auswertung möglich	5988
Alkalimetall-Ionen	Cs^+	1350	Keine Auswertung möglich
Lysin-Derivate	Ac-Lys-OMe	18	-
	H-Lys-OH	21	-

Tabelle 4.14: Übersicht der mittels Fluoreszenztitration ermittelten Dissoziationskonstanten K_D des Tweezers **750** und Clips **622** mit verschiedenen Übergangsmetall-Ionen, Erdalkalimetall-Ionen, Alkalimetall-Ionen und Lysin-Derivaten.

Wie man der Tabelle 4.14 entnehmen kann, findet nur zwischen dem Tweezer **750** und den Zn^{2+} -Ionen eine starke Wechselwirkung statt. Alle anderen Übergangsmetall-Ionen, Erdalkali- und Alkalimetall-Ionen werden dagegen 50-300 Mal schwächer gebunden. Dieser stabile Komplex ist sogar etwa viermal stabiler als der des Tweezers mit den beiden Lysin-Derivaten Ac-Lys-OMe und H-Lys-OH. Im Gegensatz zum Tweezer **750** weist der Clip **622** eine deutlich geringere Affinität gegenüber Zink-Ionen auf. Die Fluoreszenzquenchung erfolgt hier erst nach Zugabe von etwa vier Zink-Äquivalenten. Dagegen liegen die Dissoziationskonstanten der Eisen- und Kupfer-Ionen etwa in der gleichen Größenordnung wie die des Tweezers **750**. Die beiden Erdalkalimetall-Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+} werden sowohl vom Tweezer als auch vom Clip nur schwach gebunden. Ähnliches gilt auch für das Alkalimetall-Ion Caesium. Dieses wird allerdings deutlich stärker vom Tweezer als vom Clip komplexiert. Aufgrund der stark voneinander abweichenden Dissoziationskonstanten der Komplexe von Clip **622** und Tweezer **750** mit Zink- bzw. Caesium-Ionen, kann die Affinität

der untersuchten Kationen nicht allein auf die beiden negativ geladenen Phosphat-Substituenten der Inhibitoren zurückgeführt werden. Die vergleichsweise höhere Selektivität des Tweezers gegenüber dem Clip muss in einem anderen strukturellen Merkmal, wie z. B. ihrer unterschiedlichen Kavität begründet liegen. Einen Hinweis darauf lieferte die bereits publizierte Röntgenstruktur des Tweezers im Komplex mit Cs^+ -Ionen.^[195] Wie man dieser Kristallstruktur entnehmen kann, wird das Caesium-Ion mit einem Ionenradius $r = 165$ pm in der Tweezer-Kavität stark inkludiert. Dieser Ionenradius scheint für die Komplexbildung mit dem Tweezer optimal zu sein, da hier das Kation mit vier der fünf Tweezer-Benzolringe wechselwirken kann. Kalium-Ionen erfahren dagegen aufgrund ihres kleineren Ionenradius $r = 133$ pm keine derartigen stabilisierenden Wechselwirkungen mit den Tweezer-Seitenwänden innerhalb der Kavität. Im Gegensatz zum Cs^+ -Ion wird die Komplexbildung des K^+ -Ions daher eher außerhalb der Kavität chelatartig über die vier negativen Ladungen der beiden Phosphat-Substituenten erfolgen. Ähnliches sollte auch für die hier untersuchten Metall-Kationen zu erwarten sein, da deren Radius sogar deutlich geringer als der der Kalium-Ionen ist. Damit wird der zuvor postulierte Einfluss der Kavität auf die Komplexbildung hinfällig. Wie man anhand der Fluoreszenzspektren deutlich erkennen kann, werden die Übergangsmetall-Ionen Zn^{2+} ($r = 83$ pm), Fe^{2+} ($r = 78$ pm), Fe^{3+} ($r = 67$ pm) und Cu^{2+} ($r = 97$ pm) trotz ihrer geringeren Größe deutlich stärker komplexiert als die Cs^+ -Ionen. Eine plausible Erklärung dafür, warum die Dissoziationskonstanten der Kationen bei annähernd gleichem Ionenradius untereinander so stark variieren und warum der Clip **622** trotz identischer Phosphat-Substituenten bei manchen Kationen ein völlig anderes Komplexbildungsverhalten aufweist als der Tweezer **750** ist zum jetzigen Stand der Forschung noch nicht möglich.

Wie die Fluoreszenztitrations-Experimente zeigen, besteht eine hohe Selektivität des Tweezers **750** gegenüber Übergangsmetall-Ionen insbesondere gegenüber Zink-Ionen. Diese hohe Affinität des Tweezers gegenüber Zink-Ionen unterstützt ebenfalls die These, dass die PARP-1-Inhibition sehr wahrscheinlich in den beiden Zinkfinger-Motiven begründet liegt. Dass es bei dieser Bindung zu einer direkten Freisetzung der koordinativen Zink-Ionen kommt ist allerdings unwahrscheinlich. Dagegen sprechen vor allem die Ergebnisse der Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente mit dem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe. Würde tatsächlich eine Zinkfreisetzung erfolgen, dann hätte sich die enzymatische Aktivität nach vorausgegangener vollständiger Inhibition durch den Tweezer **750** auch nach Zugabe des Lysin-Derivates nicht mehr zurückgewinnen lassen. Eine Zinkfreisetzung würde unmittelbar zur irreversiblen Denaturierung von PARP-1 führen. Auch ein Blick in die Kristallstrukturen

beider Zinkfinger-Motive offenbart, dass die koordinativen Zink-Ionen im Gegensatz zu den meisten auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenresten schwerer zugänglich sind. Dies spricht ebenfalls gegen eine Komplexbildung der Zink-Ionen in der Tweezer-Kavität. Den endgültigen Beweis dafür lieferte schließlich ein ^1H -NMR-Experiment.

4.4.2.11.2 ^1H -NMR-Experimente zur Komplexbildung des Tweezers 750 mit dem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe in Anwesenheit von Zink-Ionen

Dazu wurden die ^1H -NMR-Spektren des Tweezers **750** sowie seines Komplexes mit dem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe einmal in Abwesenheit und einmal in Anwesenheit von ZnCl_2 aufgenommen. Als Lösungsmittel diente ein auf D_2O basierender Phosphatpuffer (pH = 7.2). Um die Spektren miteinander vergleichen zu können, enthielten alle Proben stets die gleichen Konzentrationen an Tweezer **750** (4.9 mM), Ac-Lys-OMe (5.9 mM) und ZnCl_2 (10.5 mM).

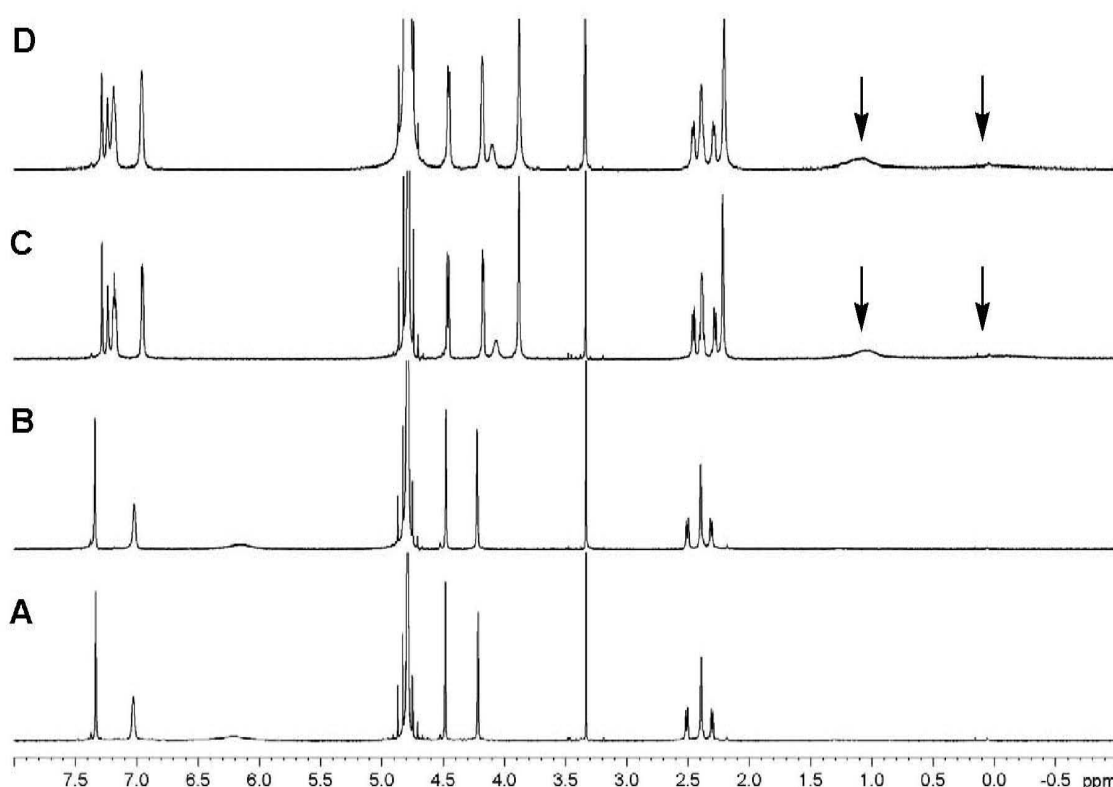


Abbildung 4.88: ^1H -NMR-Spektren des Tweezers **750** sowie seines Komplexes mit dem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe in Ab- und Anwesenheit von Zink-Ionen. A: Tweezer **750** in Abwesenheit von ZnCl_2 ; B: Tweezer **750** in Anwesenheit von ZnCl_2 ; C: Tweezer**750**@Ac-Lys-OMe in Abwesenheit von ZnCl_2 ; D: Tweezer**750**@Ac-Lys-OMe in Anwesenheit von ZnCl_2 .

Wie man den vier ^1H -NMR-Spektren in Abbildung 4.88 entnehmen kann, wird weder der Tweezer **750** selbst noch die Komplexbildung zwischen Tweezer **750** und dem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe beeinflusst bzw. verhindert. Sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit der Zink-Ionen sind die hochfeldverschobenen Methylen-Protonen des Lysin-Derivats deutlich zu erkennen. Die Kavität des Tweezers bleibt also auch in Gegenwart der Zink-Ionen für die basischen Aminosäurenreste frei zugänglich. Aufgrund dieser Tatsache und seiner hohen Affinität gegenüber Zink-Ionen ist es daher wahrscheinlich, dass der Tweezer **750** bevorzugt basische Aminosäurenreste in unmittelbarer Nähe dieser koordinativen Zink-Ionen komplexiert. Durch diese Komplexbildung könnte z. B. eine Konformationsänderung innerhalb der beiden Zinkfinger-Motive induziert werden, die zum Verlust ihrer Fähigkeit DNA-Strangbrüche zu detektieren beitragen würde. Die Folge wäre Inhibition der enzymatischen Aktivität. Um den Unterschied zwischen Zink- und Cesium-Ionen hervorzuheben, wurde das gleiche ^1H -NMR-Experiment mit Cesiumcarbonat anstelle von Zinkchlorid durchgeführt.

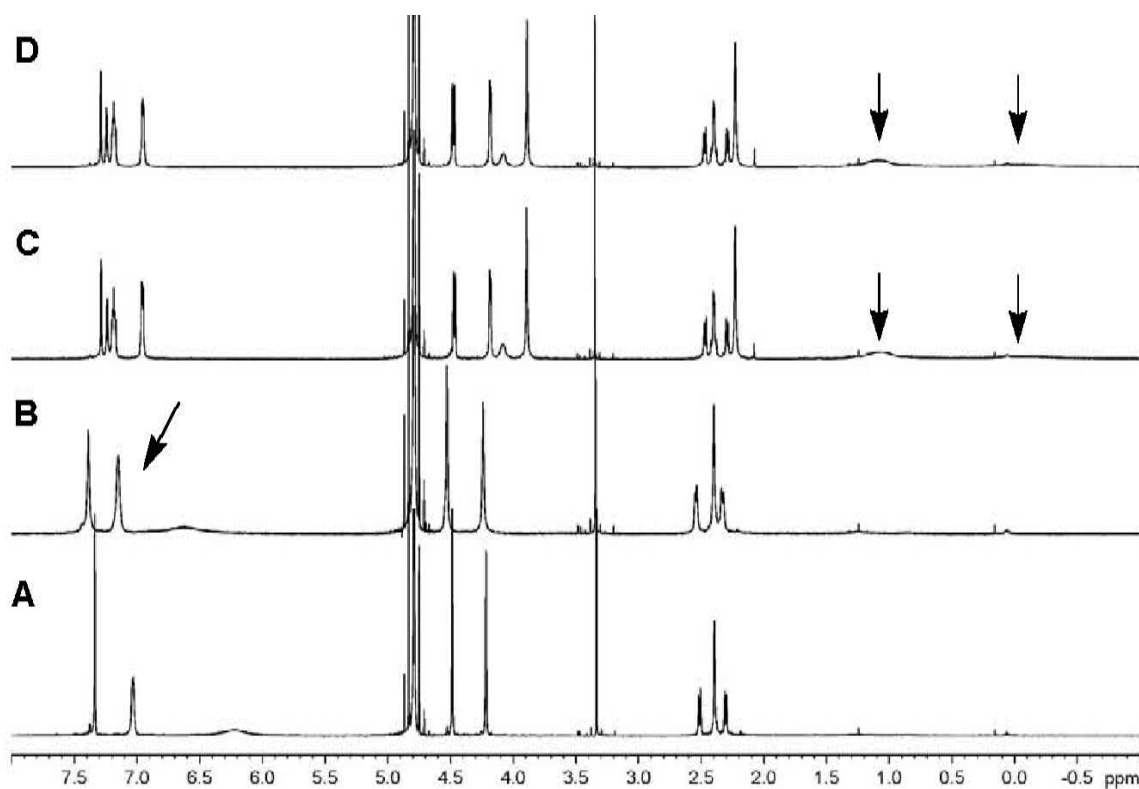


Abbildung 4.89: ^1H -NMR-Spektren des Tweezers **750** sowie seines Komplexes mit dem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe in Ab- und Anwesenheit von Cesium-Ionen. A: Tweezer **750** in Abwesenheit von Cs_2CO_3 ; B: Tweezer **750** in Anwesenheit von Cs_2CO_3 ; C: Tweezer@Ac-Lys-OMe in Abwesenheit von Cs_2CO_3 ; D: Tweezer@Ac-Lys-OMe in Anwesenheit von Cs_2CO_3 .

Die Konzentrationen betrugen hier ebenfalls 4.9 mM an Tweezer **750**, 5.9 mM an Ac-Lys-OMe und 10.5 mM an Cs_2CO_3 . Wie man der Abbildung 4.89 entnehmen kann, erfolgt im Gegensatz zu den Zink-Ionen in Anwesenheit von Caesium-Ionen eine Verschiebung der Tweezer-Protonen ins tiefe Feld. Dies bestätigt die in der Literatur beschriebene Komplexierung der Caesium-Ionen innerhalb der Kavität des Tweezers.^[195] Allerdings lassen sich diese in Anwesenheit des Lysin-Derivats Ac-Lys-OMe leicht wieder aus der Kavität des Tweezers verdrängen. Wie bereits zuvor im Fall der Zink-Ionen wird auch hier die Komplexbildung zwischen Tweezer **750** und dem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe nicht beeinflusst.

Eine weitere Inhibitionsmöglichkeit des Tweezers **750**, die als nächstes überprüft wurde, betrifft seine Affinität gegenüber der DNA. Falls Tweezer **750** wirklich an die DNA binden sollte, was aufgrund der vorhandenen repulsiven Wechselwirkungen der Phosphodiesterbindungen der DNA und der beiden Phosphat-Gruppen des Tweezers **750** als recht unwahrscheinlich gilt, könnte dies ebenfalls zu einer Inhibition von PARP-1 führen. In diesem Fall wäre es denkbar, dass Tweezer **750** die DNA regelrecht abschirmen könnte, so dass eine Detektion vorhandener DNA-Strangbrüche durch die beiden Zinkfinger-Motive nicht mehr möglich ist. Nicht die Komplexierung kritischer basischer Aminosäurenreste der beiden Zinkfinger-Motive sondern die Wechselwirkung zwischen Tweezer und DNA wären in diesem Fall für die Inhibition verantwortlich.

4.4.2.11.3 Untersuchung der DNA-Bindung durch den Tweezer 750

Um diese Möglichkeit der Inhibition überprüfen zu können, wurde fluoreszenzmarkierte DNA der Firma Metabion[®] bestellt. Diese bestand aus zwei komplementären 20er-DNA-Einzelsträngen, von denen einer am 5'-Ende Fluorescein als Fluoreszenzsonde trug. Fluorescein weist bei einer Anregung von 485 nm eine Emission bei 514 nm auf. Sollte nun der Tweezer **750** in der Lage sein die DNA zu binden, dann müsste sich dies durch ein Quenchen der DNA-Fluoreszenz bei 514 nm bemerkbar machen.

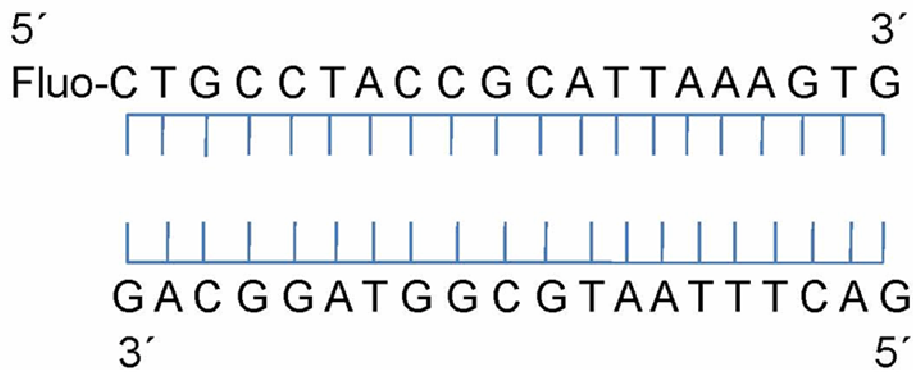


Abbildung 4.90: Fluoreszenzmarkierte „intakte“ DNA.

Im Gegensatz zu der im PARP-1-Assay eingesetzten „aktivierten“ DNA weist diese in Abbildung 4.90 dargestellte „intakte“ DNA allerdings keinen DNA-Einzelstrangbruch auf. In wie weit dies eine eventuelle Affinität des Tweezers **750** gegenüber der DNA beeinträchtigen könnte, war ungewiss. Um möglichst realitätsnah zu bleiben, wurde daher ein weiteres Basenpaar bestellt, mit dem ein DNA-Einzelstrangbruch simuliert werden sollte. Dazu wurde der gleiche mit Fluorescein am 5'-Ende markierte 20er-DNA-Einzelstrang mit zwei 10er-DNA-Einzelsträngen vereinigt. Einer dieser beiden 10er-DNA-Einzelstränge wies dabei am terminalen 5'-Ende ein nichtkomplementäres Basenpaar auf. Die daraus resultierende Repulsion sollte das nichtkomplementäre Basenpaar dieses 10er-DNA-Strangs nach außen wegzeigen lassen und damit den DNA-Einzelstrangbruch imitieren. Die „aktivierte“ DNA1 ist in Abbildung 4.91 dargestellt.

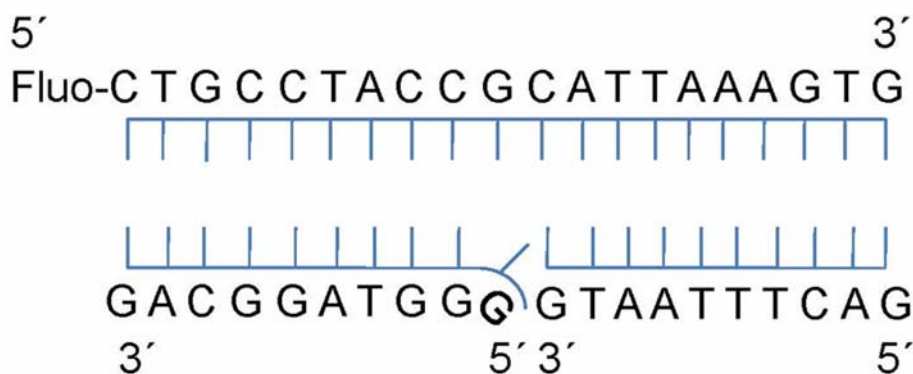


Abbildung 4.91: Fluoreszenzmarkierte „aktivierte“ DNA1 mit simuliertem DNA-Einzelstrangbruch.

Allerdings unterscheidet sich dieser simulierte DNA-Einzelstrangbruch deutlich von einem natürlich vorkommenden. Der größte Unterschied besteht darin, dass bei diesem künstlich

induzierten Strangbruch die Basenpaare beeinflusst werden. Normalerweise bleiben bei DNA-Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen die Basenpaare intakt und nur die äußere Phosphodiesterbindung mit den verknüpften hydrophilen Zuckerresten wird unterbrochen. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Versuch unternommen, den DNA-Strangbruch noch besser zu simulieren. Dies gelang durch Vereinigung des gleichen fluoreszenzmarkierten 20er-DNA-Strangs mit zwei komplementären 10er-DNA-Einzelsträngen. Auf diese Weise bleiben alle Basenpaare unversehrt und der Bruch zwischen den beiden 10er-Einzelsträngen ähnelt am besten einem natürlichen DNA-Einzelstrangbruch. Die Abbildung 4.92 zeigt die Struktur der „aktivierten“ DNA2.

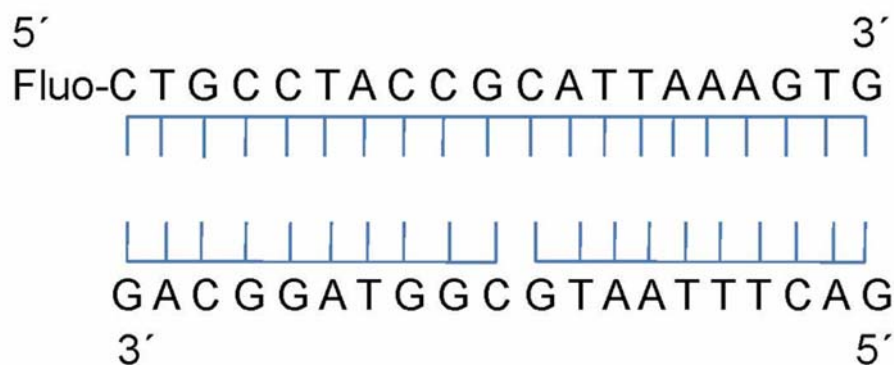


Abbildung 4.92: Fluoreszenzmarkierte „aktivierte“ DNA2 mit simuliertem DNA-Einzelstrangbruch.

Bevor mit den Fluoreszenz-Experimenten begonnen werden konnte, mussten die DNA-Einzelstränge zu den jeweiligen DNA-Doppelsträngen vereinigt werden.

4.4.2.11.3.1 Generierung der DNA

Die entsprechende Vorgehensweise ist im Kapitel 6.3.3.7 beschrieben. Um zu überprüfen, ob sich der DNA-Doppelstrang wirklich gebildet hat, wurde anschließend eine DNA-Schmelzkurve aufgenommen. Dazu wurde eine 5 µM DNA-Lösung in Tris-Puffer vorbereitet, deren Absorptionsspektrum bei 260 nm über ein Temperaturintervall von 20-80 °C verfolgt wurde. Das Prinzip dieser Messmethode, das in Abbildung 4.93 detailliert dargestellt ist, beruht darauf, dass mit steigender Temperatur die Wasserstoffbrückenbindungen, die den Doppelstrang zusammenhalten, zunehmend schwächer werden. Folglich nimmt die Zahl der Einzelstrangabschnitte zu. Gleichzeitig erhöht sich die relative Absorption bei 260 nm so

lange bis die DNA vollständig als Einzelstrang vorliegt. Die halbmaximale Absorption des DNA-Einzelstrangs entspricht der Schmelztemperatur T_m . Im Fall der „intakten“ DNA beträgt diese 66 °C. Die dazugehörige Schmelzkurve ist in der Abbildung 4.94 dargestellt.

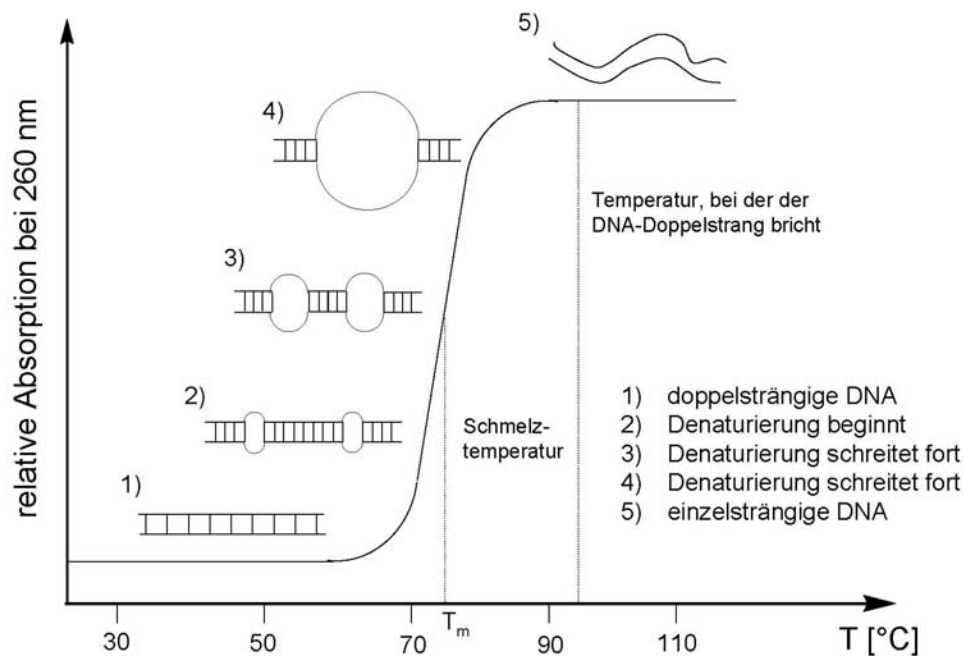


Abbildung 4.93: Allgemeines Prinzip zur Bestimmung einer DNA-Schmelzkurve.

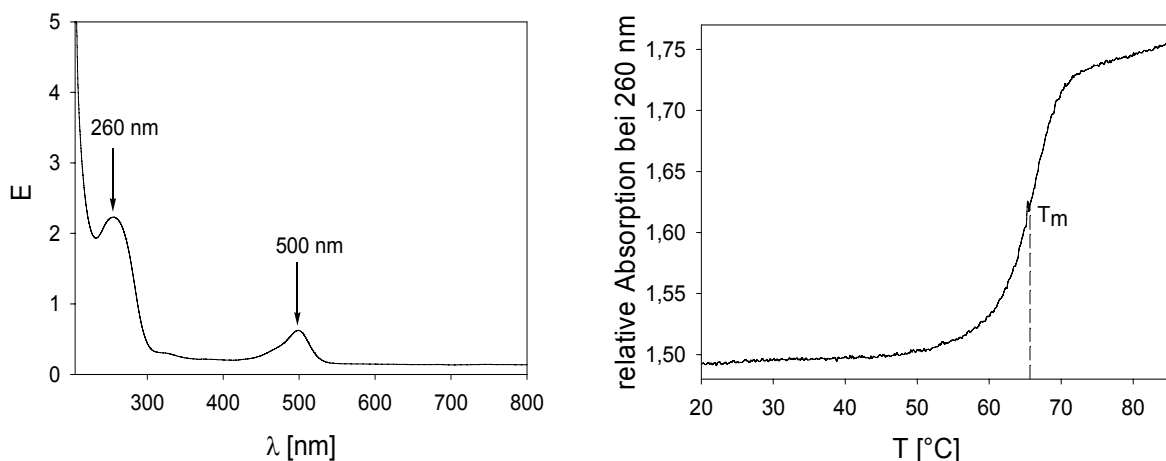


Abbildung 4.94: Absorptionsspektrum und DNA-Schmelzkurve der doppelsträngigen „intakten“ DNA.

Analog dazu wurden auch die drei DNA-Einzelstränge der beiden „aktivierten“ DNA-Varianten 1 und 2 jeweils zu einem Doppelstrang vereinigt, deren Bildung ebenfalls mittels DNA-Schmelzkurven überprüft wurde. Dabei wurden für die „aktivierte“ DNA1 zwei Schmelztemperaturen erhalten (Abbildung 4.95). Diese lagen bei 35 °C und 48 °C. Für die „aktivierte“ DNA2 ergab sich dagegen wieder nur eine Schmelztemperatur von etwa 47 °C (Abbildung 4.96).

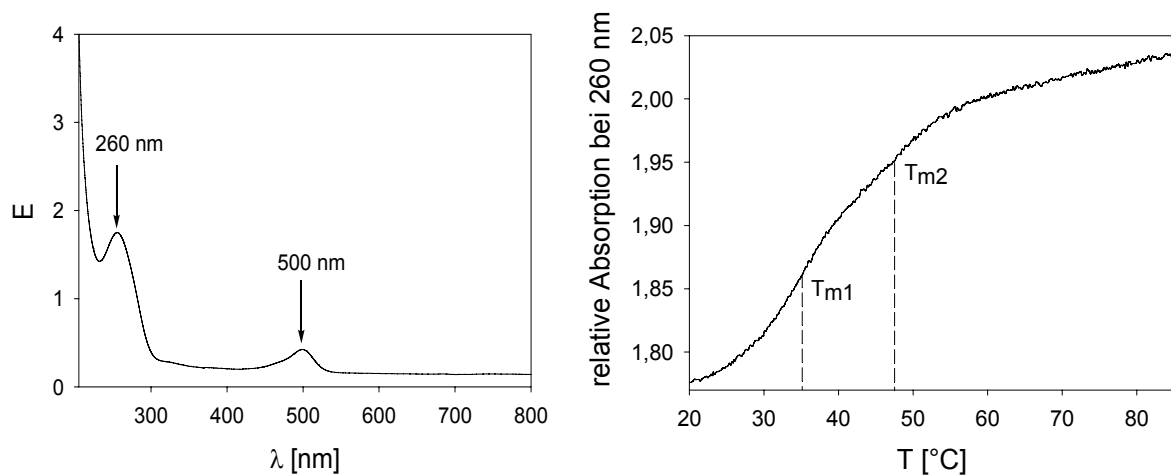


Abbildung 4.95: Absorptionsspektrum und DNA-Schmelzkurve der doppelsträngigen „aktivierten“ DNA1.

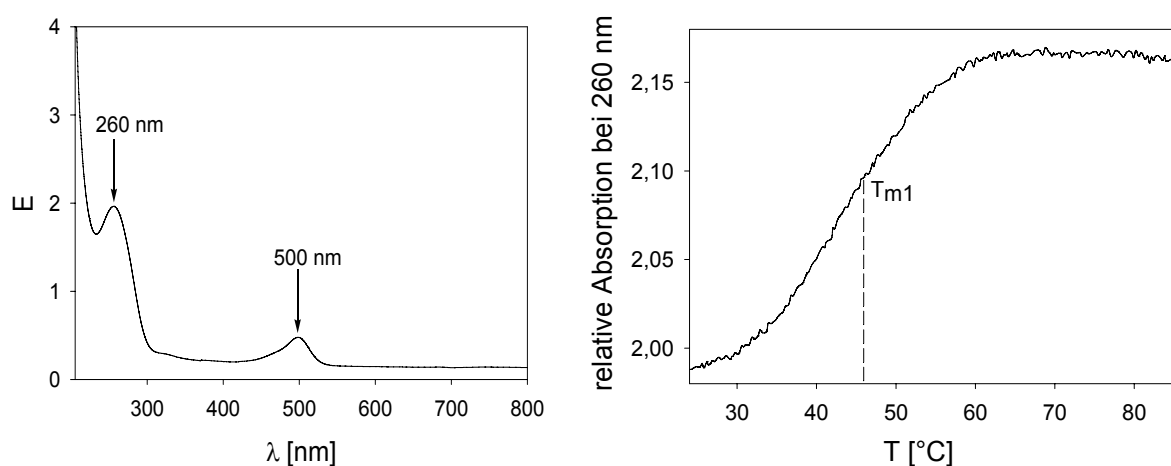


Abbildung 4.96: Absorptionsspektrum und DNA-Schmelzkurve der doppelsträngigen „aktivierten“ DNA2.

Wie man den beiden Schmelzkurven entnehmen kann, hat sich jeweils der DNA-Doppelstrang gebildet. Dass die Schmelztemperaturen der beiden „aktivierten“ DNAs niedriger liegen als die der „intakten“ DNA lässt sich mit dem nichtkomplementären Basenpaar im Fall der „aktivierten“ DNA1 bzw. der Lücke in der Phosphodiester-Bindung im Fall der „aktivierten“ DNA2 erklären. Diese beiden Anomalien tragen vermutlich zu einem

deutlichen Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen und damit zu deren erhöhten Instabilität bei. Das Auftreten zweier Schmelzpunkte im Fall der „aktivierten“ DNA1 kann auf die unterschiedlichen Dissoziationsgeschwindigkeiten beider 10er-DNA-Einzelstränge von dem fluoreszenzmarkierten 20er-DNA-Einzelstrang zurückgeführt werden. Der 10er-DNA-Einzelstrang mit dem nichtkomplementären Basenpaar müsste sich aufgrund der Repulsion schneller lösen als der entsprechende komplementäre 10er-DNA-Strang. Im Fall der „aktivierten“ DNA2 hätte man ebenfalls aufgrund der drei vereinigten DNA-Einzelstränge zwei Schmelztemperaturen beobachten müssen. Allerdings liegen diese vermutlich zu dicht beieinander oder sind sogar deckungsgleich, da hier beide 10er-DNA-Einzelstränge mit dem 20er-DNA-Einzelstrang komplementär waren. Um einen ersten Hinweis auf die Effektivität des Tweezers **750** als eventuellen DNA-Binder zu bekommen, wurden die Fluoreszenzspektren beider DNA-Varianten bei konstanter Konzentration in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen gemessen. Die Anregung erfolgte bei 485 nm. Für den Fall, dass Tweezer **750** die DNA wirklich binden sollte, müsste eine Quenchung der Fluoreszenzsonde Fluorescein bei einer Wellenlänge von 514 nm erfolgen.

4.4.2.11.3.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der DNA-Bindung durch den Tweezer 750

Es wurden Stammlösungen der drei DNA-Varianten, sowie des Inhibitors **750** vorbereitet. Die Konzentrationen betrugen 2.5 μM für die „intakte“ DNA, 1.65 μM für die „aktivierte“ DNA1 und DNA2, sowie 1.5 mM für Tweezer **750**. Als erstes wurden die Fluoreszenzspektren der reinen Verbindungen aufgenommen. Dazu wurden von den Stammlösungen jeweils 50 μL in die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte pipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Konzentrationen des Tweezers **750**, denen bei der späteren Kombination mit der DNA entsprachen, um diese miteinander vergleichen zu können. Die Anregung erfolgte bei 485 nm. Auf diese Weise konnten die Ausgangs-Fluoreszenzintensitäten aller drei DNA-Varianten ermittelt werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass keine Überschneidung der Fluoreszenzintensität des Inhibitors mit der der DNA erfolgte. Anschließend wurden alle drei DNA-Varianten mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen kombiniert. Um eine konstante DNA-Konzentration gewährleisten zu können, wurde der Inhibitor in der jeweiligen DNA-Stammlösung gelöst. Die Konzentration der „intakten“ DNA betrug während der gesamten Messreihe 2.5 μM und die

der „aktivierten“ DNA1 und DNA2 jeweils 1.65 μM . Die Endkonzentrationen des Inhibitors betragen dagegen 300 μM und 750 μM . Dieser große Überschuss an Tweezer **750** gegenüber der DNA stimmt ungefähr mit dem der im PARP-1-Assay vorliegenden Stöchiometrie überein. Im PARP-1-Assay lässt sich das Verhältnis von Inhibitor zu DNA nur grob abschätzen, da in dem von Trevigen[®] mitgelieferten Datenblatt der aktivierten DNA die Anzahl der vorhandenen DNA-Basenpaare mit 200-500 beziffert wird. Unter der Annahme, dass jedes Basenpaar ein Molekulargewicht von ca. 600 g/mol aufweist, ergibt sich für den PARP-1-Assay eine DNA-Konzentration, die zwischen 33 nM und 83 nM variiert. Setzt man nun diese Konzentrationen mit der des Tweezers **750** am IC_{50} -Wert (4 μM) in Beziehung, dann ergibt sich ein Überschuss von ca. 50-120 Äquivalenten des Tweezers gegenüber der DNA. Dieses Verhältnis wird am besten jeweils durch die in den Abbildungen 4.97 und 4.98 dargestellte pinkfarbene Kurve wiedergegeben.

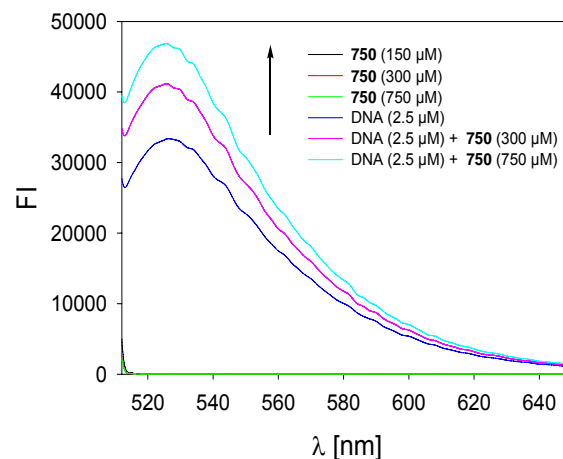


Abbildung 4.97: Fluoreszenzspektren der „intakten“ DNA in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitor-konzentrationen. Die Anregung erfolgte bei 485 nm.

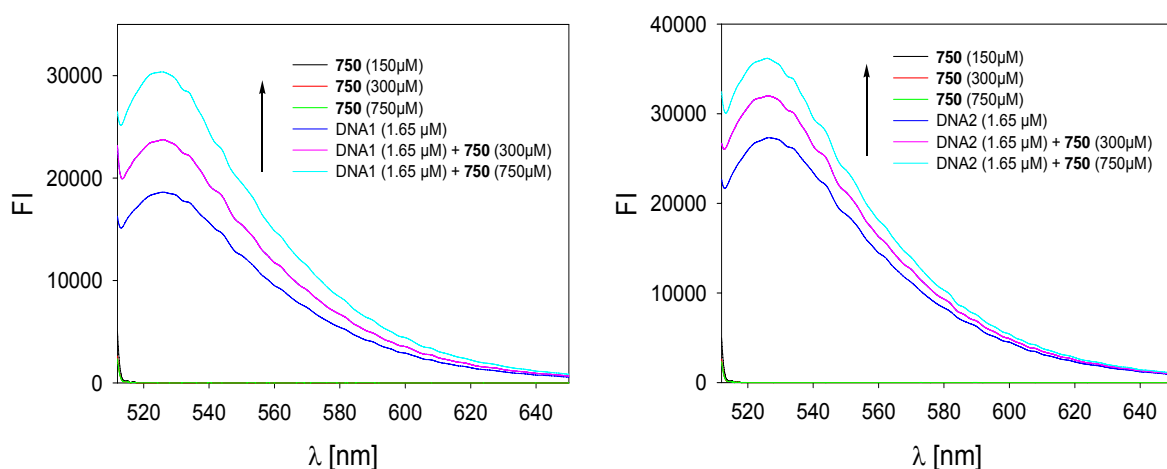


Abbildung 4.98: Fluoreszenzspektren der „aktivierten“ DNA1 (links) und „aktivierten“ DNA2 (rechts) in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitor-konzentrationen. Die Anregung erfolgte bei 485 nm.

Wie man den Fluoreszenzkurven aller drei DNA-Varianten entnehmen kann, findet in Gegenwart des Tweezers **750** anstelle der erwarteten Fluoreszenz-Quenchung eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität der Sonde statt. Dies deutet auf eine Interaktion des Tweezers mit der DNA hin. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität könnte z. B. auf π - π -Stapel-Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Benzolringen der Pinzette mit dem Fluorophor der Sonde beruhen. Ein ähnliches Verhalten von Inhibitoren gegenüber der DNA wurde bereits bei einigen Benzamid-Derivaten beobachtet.^[159, 196] Allerdings scheint die Bindung des Inhibitors **750** an die DNA nur schwach zu sein, da ein großer Überschuss an Tweezer **750** erforderlich ist. Dies sollte in einem weiteren Experiment verdeutlicht werden. Dazu wurde die Fluoreszenzkurve der „aktivierten“ DNA2 in Gegenwart des Enzyms PARP-1 gemessen, das bekanntlich über seine beiden Zinkfinger-Motive stark an die DNA bindet. Falls PARP-1 stärker an die „aktivierte“ DNA2 bindet als der Tweezer **750**, sollte in diesem Fall eine geringere Konzentration an PARP-1 erforderlich sein, um eine ähnliche Fluoreszenzintensitäts-Zunahme wie im Fall des Tweezers zu erzielen. Im PARP-1-Assay beträgt die Enzymkonzentration etwa 17 nM. Dies bedeutet, dass die DNA im 2- bis 5-fachen Überschuss gegenüber dem Enzym vorliegt. Um eine vollständige Bindung von PARP-1 an die DNA2 zu gewährleisten, sollte hier die Enzymkonzentration so gewählt werden, dass PARP-1 im leichten Überschuss vorliegt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich durch Zugabe von Tweezer **750** die Bindung von PARP-1 an die „aktivierte“ DNA2 negativ beeinflussen lässt. Falls Tweezer **750** tatsächlich an die Zinkfinger-Motive von PARP-1 bindet, wie bereits postuliert wurde, dann müsste durch diese Komplexierung die Interaktion zwischen PARP-1 und der DNA geschwächt werden. Diese Schwächung würde sich dann durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität äußern. Bei vollständiger Inhibition müsste sich sogar schließlich das ursprüngliche Fluoreszenzspektrum der DNA zurückgewinnen lassen.

4.4.2.11.3.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der DNA-Bindung durch PARP-1

Die PARP-1-Konzentration von Trevigen[®] beträgt etwa 920 nM. Um möglichst wenig PARP-1 einsetzen zu müssen, wurde das Enzym 1:50 verdünnt. Die Endkonzentration betrug damit 18.5 nM PARP-1 pro Well. Entsprechend wurde eine DNA-Stammlösung der „aktivierten“ DNA2 mit einer Konzentration von 12.5 nM angesetzt. Diese Konzentrationen

ließen sich mittels Fluoreszenzspektroskopie noch zuverlässig untersuchen. Damit die DNA-Konzentration während der gesamten Messreihe konstant blieb, wurde der Inhibitor in der jeweiligen 12.5 nM DNA-Stammlösung gelöst. Die Endkonzentrationen betrugen pro Well 12.5 nM „aktivierte“ DNA2, 60 nM - 3 μ M Tweezer **750** und 18.5 nM PARP-1. Die Anregung erfolgte wiederum bei 485 nm. Allerdings musste die manuelle Verstärkung, die Empfindlichkeit, aufgrund der geringen Konzentrationen von 80 auf 150 erhöht werden. In der Abbildung 4.99 sind die entsprechenden Fluoreszenzspektren dargestellt.

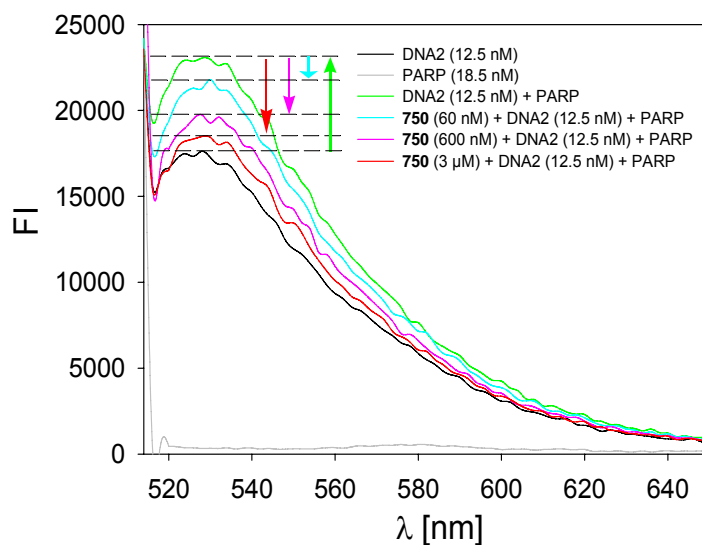


Abbildung 4.99: Fluoreszenzspektren der „aktivierten“ DNA2 (12.5 nM) in Anwesenheit von PARP-1 (18.5 nM) und Tweezer **750** (60 nM, 600 nM, 3 μ M). Die Anregung erfolgte bei 485 nm.

Zunächst wurde die Fluoreszenzintensität der reinen „aktivierten“ DNA2-Lösung vermessen. Ihr FI-Wert beträgt etwa 17000. Durch Zugabe von PARP-1 erfolgt ein starker Fluoreszenzanstieg auf etwa 24000. Dieser Fluoreszenzanstieg ist ein Zeichen dafür, dass PARP-1 an die „aktivierte“ DNA2 bindet und zwar deutlich stärker als der Tweezer **750**. Um den gleichen Fluoreszenzanstieg zu erreichen müssen im Fall des Tweezers **750** insgesamt 120 Äquivalente Inhibitor bzgl. der DNA eingesetzt werden. Im Fall von PARP-1 sind es dagegen lediglich 1.5 Äquivalente. Damit bindet PARP-1 ca. 80mal stärker an die DNA als der Tweezer **750**. In Anwesenheit des Tweezers **750** fällt dagegen der durch PARP-1 hervorgerufene Fluoreszenzanstieg deutlich geringer aus. Dieser nimmt mit zunehmender Inhibitorkonzentration kontinuierlich ab. Bei einem 160-fachen Überschuss an Tweezer **750** bzgl. PARP-1 lässt sich letztendlich annähernd das ursprüngliche Spektrum der reinen „aktivierten“ DNA2 zurück gewinnen. Dieses Fluoreszenz-Experiment stützt das Postulat,

dass der Inhibitor **750** die beiden Zinkfinger-Motive von PARP-1 komplexiert und dadurch die Bindung von PARP-1 an die DNA verhindert. Einen direkten Beweis dafür sollten letztendlich ein Ultrafiltrationsexperiment sowie ein Dialyseexperiment erbringen.

Zuvor sollte allerdings noch die Bindungskonstante K_a für den Tweezer **750** und der DNA mittels Fluoreszenztitration bestimmt werden. Da sich der Inhibitor gegenüber allen drei DNA-Varianten gleich effektiv verhält, wurde die Titration nur mit der „intakten“ DNA durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 485 nm. Zuerst wurde die Titration bei niedriger Stöchiometrie bis zu einem 16-fachen Überschuss an Tweezer **750** gegenüber der DNA durchgeführt. Die Fluoreszenzänderung war in diesem Fall nur minimal. Eine Auswertung der Ergebnisse war hier nicht möglich. (Abbildung 6.16, Experimenteller Teil) In einem zweiten Fluoreszenztitrations-Versuch wurde das Verhältnis zwischen Inhibitor und DNA höher gewählt. Dazu wurde die Fluoreszenzänderung über einen Konzentrations-Bereich zwischen einem 16- bis 300-fachen Überschuss an Tweezer **750** gegenüber der DNA verfolgt. Wie man der Abbildung 6.17 des Experimentellen Teils entnehmen kann, lässt sich in diesem Fall eine deutliche Fluoreszenzintensitäts-Änderung detektieren, so dass eine Auswertung möglich ist. Die ermittelte Bindungskonstante K_a beträgt etwa. 800 M^{-1} . Dieser niedrige K_a -Wert bestätigt die zuvor angenommene relativ schwache Bindung des Tweezers **750** an die DNA. Der inhibitorische Beitrag durch die Interaktion mit der DNA sollte daher vernachlässigbar gering sein. In der Tabelle 4.15 sind alle mit der Fluoreszenztitration ermittelten K_a -Werte des PARP-1-Projekts zusammengefasst.

	Medium	$K_a [\text{M}^{-1}]$
750 + BA	Phosphat-Puffer pH = 7.64	712
750 + DNA		839
750 + ZnCl_2		223422

Tabelle 4.15: Übersicht der mittels Fluoreszenztitration ermittelten Bindungskonstanten für Tweezer **750** mit Benzamid (BA), DNA und ZnCl_2 unter der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie.

Die durch Tweezer **750** induzierte PARP-1 Inhibition ist also nicht auf eine Bindung des Inhibitors an die DNA zurückzuführen, sondern muss in einem anderen Angriffspunkt, wie z. B. den beiden Zinkfinger-Motiven, begründet liegen. Dafür sprechen auch die bereits durchgeführten Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente sowie die Fluoreszenztitrations-

Experimente des Tweezers mit den Zink-Ionen. Endgültige Gewissheit sollten nun ein Ultrafiltrationsexperiment sowie ein Dialyseexperiment ergeben. Mit beiden Methoden sollte überprüft werden, ob der Tweezer **750** an PARP-1 binden kann, insbesondere an die beiden Zinkfinger-Motive. Um diesen Nachweis erbringen zu können, mussten beide Methoden eine grundlegende Voraussetzung erfüllen. Sowohl die Membran-Porengröße des Centricons als auch die des Dialysegefäßes mussten groß genug gewählt werden, um eine Permeabilität der fluoreszenzmarkierten „aktivierten“ DNA2, nicht aber des Enzyms gewährleisten zu können. Da die „aktivierte“ DNA2 mit 20 Basenpaaren lediglich ein Molekulargewicht von etwa 12 kDa aufweist, sollte eine Porengröße von 30 kDa im Fall des Centricons und eine von 20 kDa im Fall der Dialysegefäße jeweils ausreichend sein. Dies wurde für beide Methoden in einem Kontrollexperiment, das lediglich „aktivierte“ DNA2 enthielt, überprüft. Für den Fall, dass die „aktivierte“ DNA2 die jeweilige Membran passieren kann, sollte sich diese später im Filtrat fluoreszenzspektroskopisch nachweisen lassen. Da die DNA2-Konzentration, sowie die der anderen Komponenten PARP-1 und Tweezer **750** in allen Experimenten konstant gehalten wird, können später alle erhaltenen FI-Werte miteinander verglichen werden. Der FI-Wert, der sich aus dem Kontrollexperiment für die „aktivierte“ DNA2 ergab, entspricht dabei der 100%igen Permeabilität der eingesetzten DNA2-Menge. Anschließend sollten die eigentlichen Experimente durchgeführt werden, die Aufschluss über den Einfluss des Tweezers **750** bzgl. der Bindung von PARP-1 an die DNA2 liefern sollten. Dazu wurden PARP-1 und „aktivierte“ DNA2 einmal in Abwesenheit und einmal in Anwesenheit des Inhibitors miteinander inkubiert. In Abwesenheit des Tweezers **750** sollte PARP-1 fest an die DNA2 binden und sich damit nicht mehr in den Filtraten beider Methoden nachweisen lassen. In Anwesenheit des Tweezers **750** sollte dagegen die Bindung der „aktivierten“ DNA2 an PARP-1 gestört oder sogar vollständig verhindert werden. In diesem Fall müsste sich die „aktivierte“ DNA2 wieder in beiden Filtraten nachweisen lassen können.

4.4.2.11.4 Ultrafiltrationsexperiment

Mit Hilfe des Ultrafiltrationsexperimentes konnte dieser Nachweis erbracht werden. In der Tabelle 4.16 sind die FI-Werte der drei Einzel-Messungen zusammengefasst. Im Filtrat des Kontrollexperimentes, das ausschließlich die fluoreszenzmarkierte „aktivierte“ DNA2 enthielt, konnte eine Fluoreszenzintensität von 38 detektiert werden. Dieser FI-Wert diente als Referenz für die folgenden zwei Messungen.

	FI (Filtrat)	DNA im Filtrat [%]
DNA2	38	100
PARP-1 + DNA2	13	29
PARP-1 + DNA2+ 750	23	61

Tabelle 4.16: Übersicht der im Filtrat detektierten FI-Werte nach Ultrafiltration in An- und Abwesenheit des Inhibitors **750** sowie PARP-1.

In Abwesenheit des Tweezers **750** bindet PARP-1 die „aktivierte“ DNA2. Dafür spricht der im Filtrat detektierte niedrige FI-Wert von 13. Wenn man diesen mit dem Referenzwert von 38 in Beziehung setzt, dann geht daraus hervor, dass etwa 70% der eingesetzten DNA2-Menge von PARP-1 gebunden wurden. Eigentlich hätte die „aktivierte“ DNA2 vollständig von PARP-1 gebunden werden müssen. Vielleicht ist dies allerdings gar nicht möglich, da PARP-1 nur in einem sehr geringen Überschuss bzgl. „aktivierter“ DNA2 eingesetzt wurde.

In Anwesenheit des Inhibitors **750** lässt sich dagegen im Filtrat ein deutlich höherer FI-Wert von 23 detektieren. Dieser deutet daraufhin, dass etwa 61% der ursprünglichen DNA2 die Membran passiert haben. Der Tweezer **750** muss also die Bindung von PARP-1 an die DNA2 gestört haben. Dass nicht 100% der DNA2 im Filtrat detektiert werden konnten ist vielleicht darauf zurückzuführen, dass der Tweezer **750** nur in dem Verhältnis des IC_{50} -Wertes zum Enzym dazugegeben wurde (200-facher Überschuss) wie er im PARP-1-Assay vorliegt. Folglich konnte noch keine vollständige Komplexierung der auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenreste erfolgen. Falls diese Vermutung zutreffen sollte, dürfte sich im Filtrat kein überschüssiger Tweezer **750** befinden. Dies konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

Mit Hilfe dieses Ultrafiltrationsexperimentes konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Tweezer **750** an das Enzym PARP-1 bindet und dadurch die Interaktion zwischen der DNA und dem Enzym verhindert. Dieses Ultrafiltrationsexperiment liefert damit den Nachweis eines Enzym-Inhibitor-Komplexes, der mit Hilfe der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese nicht erbracht werden konnte.

Zu dem gleichen Ergebnis sollte auch das folgende Dialyseexperiment führen.

4.4.2.11.5 Dialyseexperiment

Analog dem Ultrafiltrationsexperiment wurde auch hier zunächst ein Kontrollexperiment mit der „aktivierten“ DNA2 alleine durchgeführt. In diesem Fall konnte für die eingesetzte DNA2-Menge im Filtrat ein FI-Wert von 17.7 detektiert werden. Die Tabelle 4.17 enthält die FI-Werte der drei Einzel-Messungen, sowohl für das Filtrat als auch für den dazugehörigen Überstand. Wie man den FI-Werten der Filtrate entnehmen kann, scheint das Dialyseexperiment das Ergebnis des Ultrafiltrationsexperimentes zu bestätigen.

	FI (Filtrat)	DNA im Filtrat [%]	FI (Überstand)
DNA2	17.7	100	29
PARP-1 + DNA2	10	57	50
PARP-1 + DNA2+ 750	19.3	109	95

Tabelle 4.17: Übersicht der detektierten FI-Werte im Filtrat und im Überstand nach Dialyse in An- und Abwesenheit des Inhibitors **750**.

So konnte in Anwesenheit des Tweezers **750** im Filtrat ein FI-Wert von 19.3 detektiert werden. Dieser FI-Wert ist unwesentlich höher als der, der für die reine DNA2 erhalten wurde. Dies spricht dafür, dass der Inhibitor die Bindung der DNA2 an das Enzym PARP-1 behindert.

In Abwesenheit des Inhibitors ergab sich dagegen ein FI-Wert von 10, der damit nur halb so groß war, wie der in Anwesenheit des Tweezers. Dieser FI-Wert deutet daraufhin, dass ein Teil der DNA2 an das Enzym PARP-1 gebunden ist. Dass die DNA2 nicht vollständig von PARP-1 gebunden wird könnte wiederum damit zusammenhängen, dass PARP-1 nur in sehr geringem Überschuss gegenüber der DNA2 eingesetzt wurde.

Auf den ersten Blick scheinen die FI-Werte des Dialyse-Versuches die Ergebnisse des Ultrafiltrationsexperiments zu bestätigen. Allerdings brachte die fluoreszenztitrimetrische Untersuchung des Überstandes schnelle Ernüchterung. Da in allen Experimenten die gleiche DNA2-Konzentration eingesetzt wurde, sollte die Summe der FI-Werte für die DNA2 aus Filtrat und Überstand stets gleich groß sein. Dies war jedoch nicht der Fall. Für das

Kontrollexperiment ergab sich ein Gesamt-FI-Wert von 29. Dieser Wert hätte sich auch für die beiden anderen Fälle ergeben müssen. Für das Experiment in Gegenwart des Tweezers ergab sich allerdings ein Gesamt-FI-Wert von 95 und für das Experiment in Abwesenheit des Inhibitors einer von 50. Damit weichen die FI-Werte stark voneinander ab. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen FI-Werte könnte sein, dass die „aktivierte“ DNA2 in den Poren des Dialysegefäßes haften bleibt. Dennoch konnte mit diesem Experiment ebenfalls die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes nachgewiesen werden. Ob der Tweezer die Bindung der DNA2 an PARP-1 behindert, konnte allerdings mit Hilfe dieses Dialyse-Experiments nicht belegt werden. Einen Hinweis dafür lieferten bereits die zuvor durchgeführten Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente, die Fluoreszenz-Quench-Experimente sowie das Ultrafiltrationsexperiment. Auch die hohe Affinität des Tweezers **750** gegenüber Zink-Ionen deutet daraufhin, dass die beobachtete Inhibition von PARP-1 in den beiden Zinkfinger-Motiven begründet liegen muss.

Ob der Tweezer **750** in den beiden Zinkfinger-Motiven stabile Komplexe mit leicht zugänglichen basischen Aminosäurenresten ausbilden kann, sollte mit Hilfe des Molecular Modelling geklärt werden.

4.4.2.11.6 Molecular Modelling

Dazu wurden zunächst alle aus der PDB-Datenbank zugänglichen Kristallstrukturen beider Zinkfinger-Motive F1 und F2 auf leicht zugängliche basische Aminosäurenreste hin analysiert. Unter Berücksichtigung der hohen Affinität des Inhibitors gegenüber Zink-Ionen wurden dabei insbesondere die basischen Aminosäurenreste betrachtet, die sich in unmittelbarer Nähe der koordinativen Zink-Ionen befinden.

Für das erste Zinkfinger-Motiv F1 mit dem PDB-Code 2DMJ stellt das Lysin K-66 den günstigsten Angriffspunkt dar. Dieser mit MacroModel 9.0 berechnete Komplex zwischen dem Tweezer **750** und dem Lysin K-66 bleibt sogar bei einer MD-Simulation über einen Zeitraum von 5 ns stabil. Wie man der Abbildung 4.100 entnehmen kann, wird dieser Komplex durch die Ausbildung einer koordinativen Bindung von einem der beiden Phosphat-Substituenten des Tweezers mit dem Zink-Ion zusätzlich stabilisiert. Diese zusätzliche

Stabilisierung ist nur mit dem Lysin K-66 möglich, da sich alle anderen basischen Aminosäurenreste des ersten Zinkfinger-Motivs zu weit vom koordinativen Zink-Ion entfernt befinden. Auch für die Lysine K-29, K-30, K-37 und K-54 lassen sich ebenfalls recht stabile Komplexe berechnen. So bleibt z. B. der für das Lysin K-29 berechnete Komplex mit dem Tweezer **750** bei der MD-Simulation ebenfalls über einen Zeitraum von 5 ns stabil (Abbildung 4.100 unten).

Analog zum ersten Zinkfinger-Motiv F1 lässt sich auch für das zweite Zinkfinger-Motiv F2 mit dem PDB-Code 2CS2 ein Komplex zwischen dem Tweezer und dem Lysin K-70 berechnen, der durch die koordinative Bindung einer der beiden Phosphat-Substituenten des Inhibitors zum koordinativen Zink-Ion zusätzlich stabilisiert wird. Dieser Komplex ist in der Abbildung 4.108 dargestellt. Weitere stabile Komplexe sind ebenfalls mit den Lysinen K-36, K-39 und K-46 möglich. Diese werden durch mehrere intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zusätzlich stabilisiert. Der Komplex des Tweezers mit dem Lysin K-36 weist sogar sechs intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen auf. Beide in Abbildung 4.101 dargestellten Komplexe bleiben ebenfalls bei der MD-Simulation über einen Zeitraum von 5 ns stabil.

Das Molecular Modelling liefert aufgrund der zahlreichen berechneten stabilen Komplexstrukturen zwischen Inhibitor und den basischen Aminosäurenresten den letzten Hinweis dafür, dass die inhibitorische Effizienz des Tweezers in den beiden Zinkfinger-Motiven begründet liegen muss.

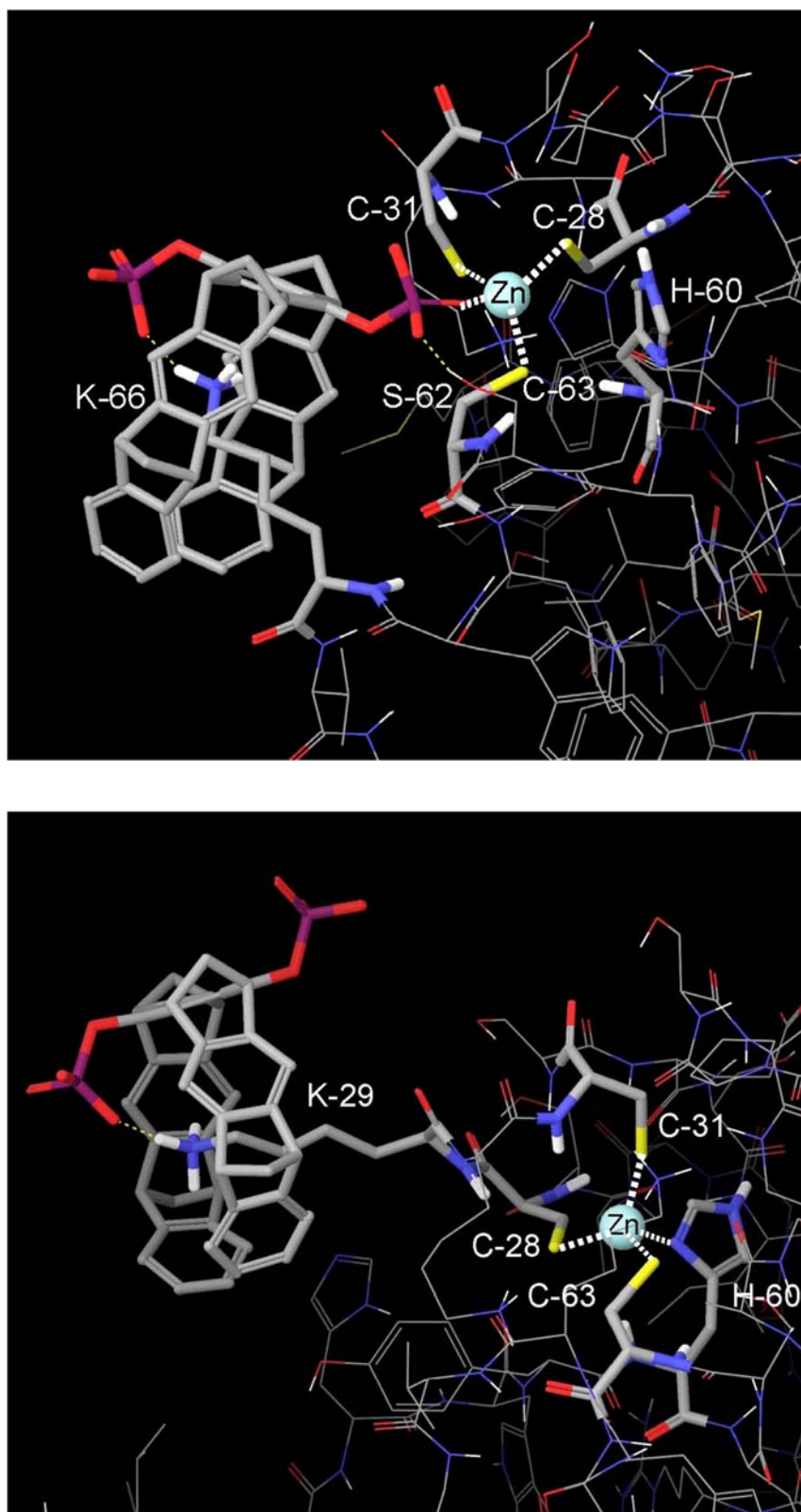


Abbildung 4.100: MD-Simulationen der beiden binären Komplexe **750@** Lys-66 (oben) und **750@** Lys-29 (unten) des ersten Zinkfinger-Motivs F1 mit dem PDB-Code: 2DMJ (MacroModel 9.0, Wasser, OPLS-A, 300 K, 5 ns).

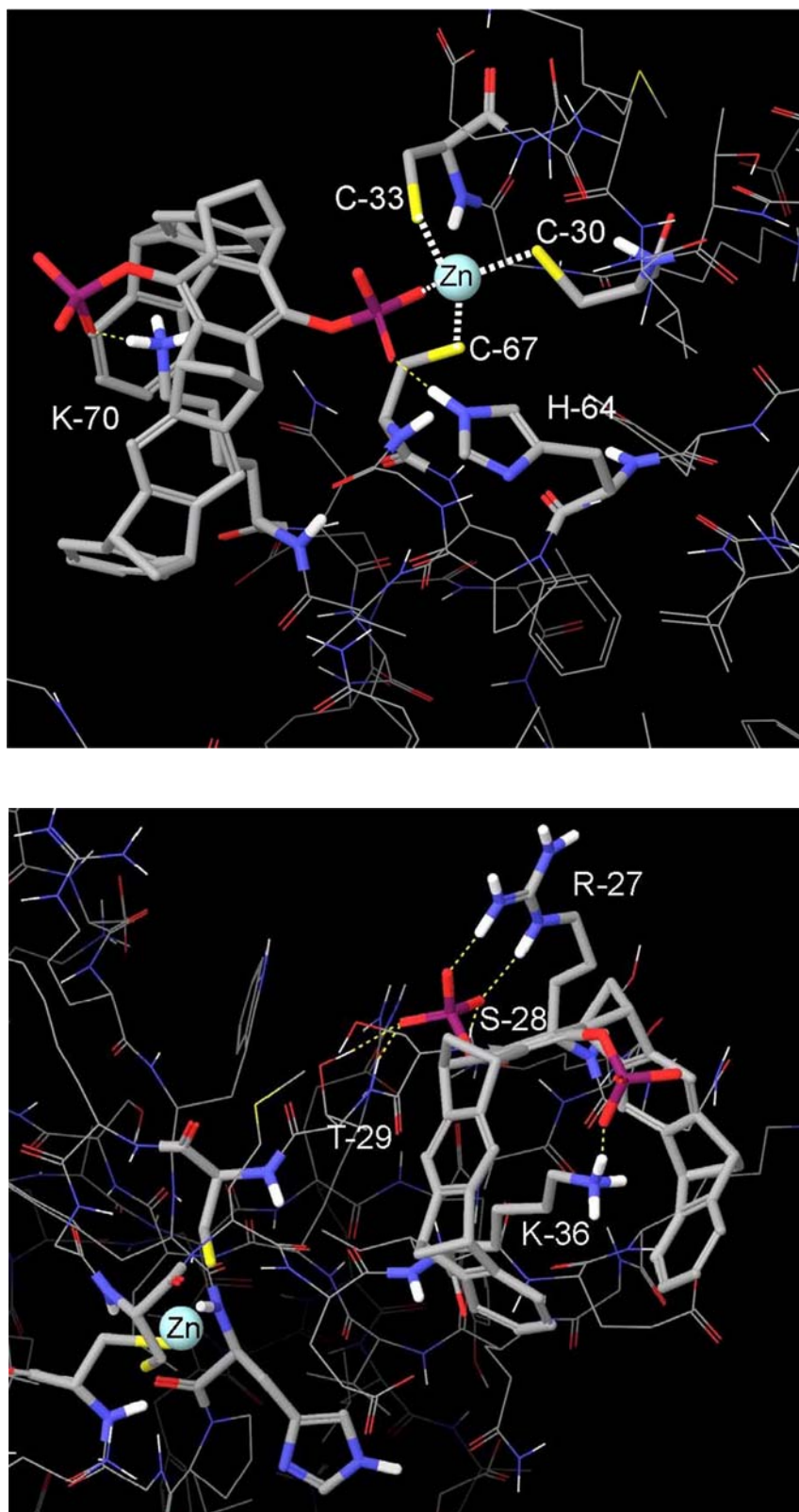


Abbildung 4.101: MD-Simulationen der beiden binären Komplexe **750@** Lys-70 (oben) und **750@** Lys-36 (unten) des zweiten Zinkfinger-Motivs F2 mit dem PDB-Code: 2CS2 (MacroModel 9.0, Wasser, OPLS-A, 300 K, 5 ns).

4.5 Modifizierung des Tweezers 750 und Clips 622 zur Optimierung ihrer inhibitorischen Effizienz und ihrer Einsatzfähigkeit als Fluoreszenzsonde in Zellkulturen

4.5.1 Synthese des Polymerisierfähigen Tweezers 8 und Clips 9

Wie die vorherigen Untersuchungen eindeutig zeigten, lassen sich die enzymatischen Aktivitäten der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) sowie der Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP-1) in Gegenwart der Rezeptormoleküle, den beiden Tweezern **734** und **750** und den beiden Clips **606** und **622**, vollständig inhibieren. Die Enzym-Inhibition erfolgt allerdings auf zwei unterschiedliche Weisen. Während die beiden Tweezer kritische Lysine auf der Proteinoberfläche komplexieren, konkurrieren die beiden Clips mit dem jeweiligen Enzym um den Cofaktor bzw. das Substrat NAD(P)^+ . Um die inhibitorische Effizienz beider Rezeptormoleküle zu erhöhen, sollte nun in einem weiteren Projekt dieser Arbeit die Synthese polymerisierfähiger Tweezer und Clips erfolgen. Ein polymerisierter Tweezer könnte z. B. in der Lage sein, mehrere benachbarte kritische Lysine in der Nähe der „Active Site“ auf einmal zu komplexieren. Gleichzeitig würde sich durch diese erhöhte inhibitorische Effizienz ein niedrigerer IC_{50} -Wert ergeben. Eine entscheidende Frage, die es hinsichtlich dieser Synthese zu klären gilt, ist die, ob der Verlust einer der beiden Phosphatgruppen des Tweezers bzw. Clips durch den Methacryl-Linker einen negativen Einfluss auf die Wasserlöslichkeit und Komplexeigenschaften beider polymerisierfähigen Rezeptormoleküle ausübt. Als Methacryl-Linker wurde *N*-Methacryloyl-6-aminocaprinsäure (**3**) verwendet. Dessen Länge schien für die beabsichtigte Copolymerisation ausreichend lang zu sein, ohne dass es zu einer sterischen Hinderung der einzelnen aneinander gereihten Tweezer- oder Clip-Moleküle kommen sollte. Für den Fall, dass durch den Verlust einer der beiden Phosphat-Substituenten eine verminderte Löslichkeit der polymerisierfähigen Verbindungen auftritt, könnte dieses Problem durch einen Überschuss an gut wasserlöslichen Zucker-Monomeren bei der Polymerisation leicht behoben werden. Die beiden Abbildungen 4.102 und 4.103 zeigen die einzelnen Syntheseschritte zur Darstellung des polymerisierfähigen Tweezers **8** und Clips **9**.

4.5.1.1 Syntheseübersicht des Tweezers 8

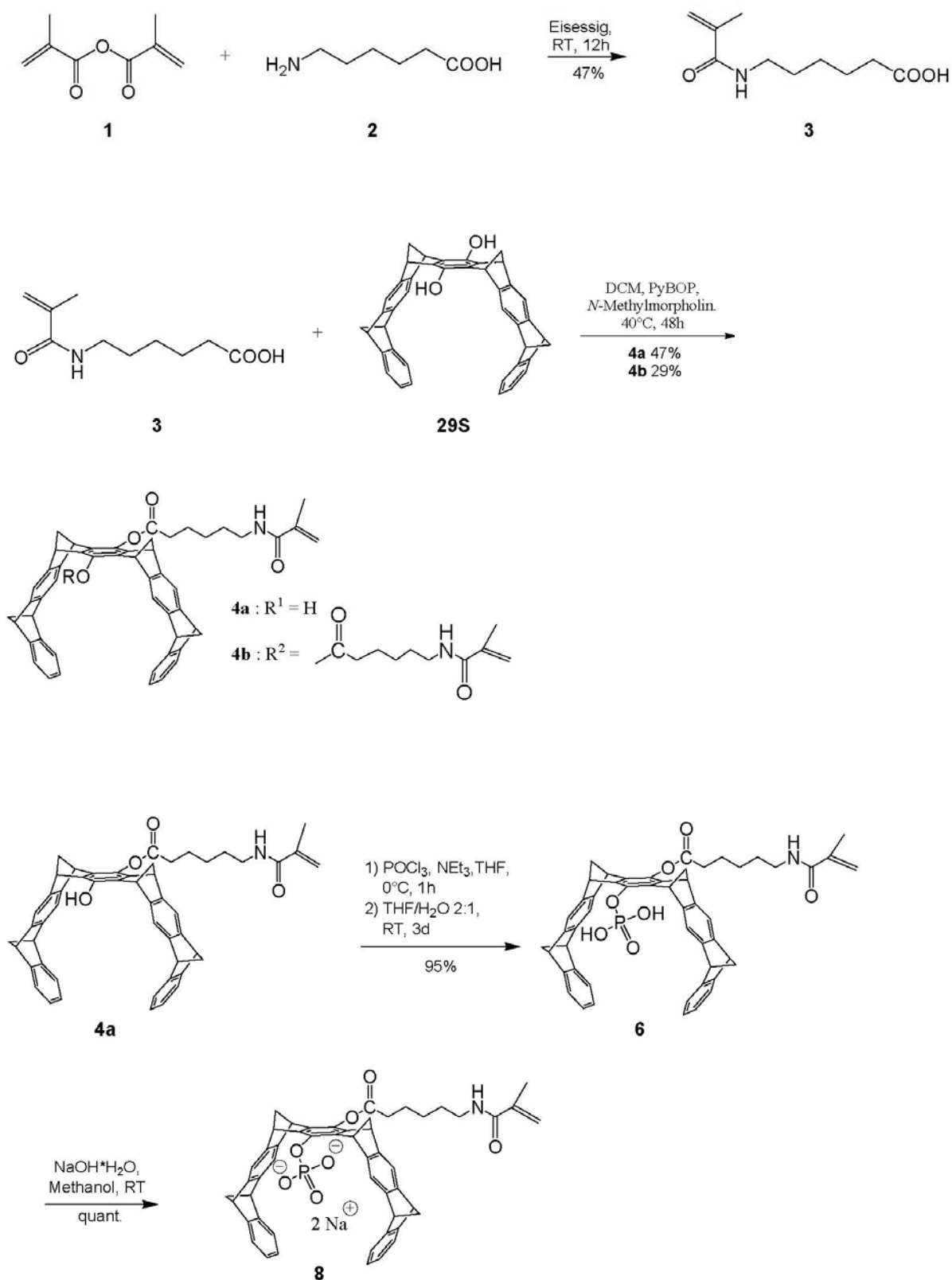


Abbildung 4.102: Synthese des polymerisierfähigen Tweezers 8.

4.5.1.2 Syntheseübersicht des Clips 9

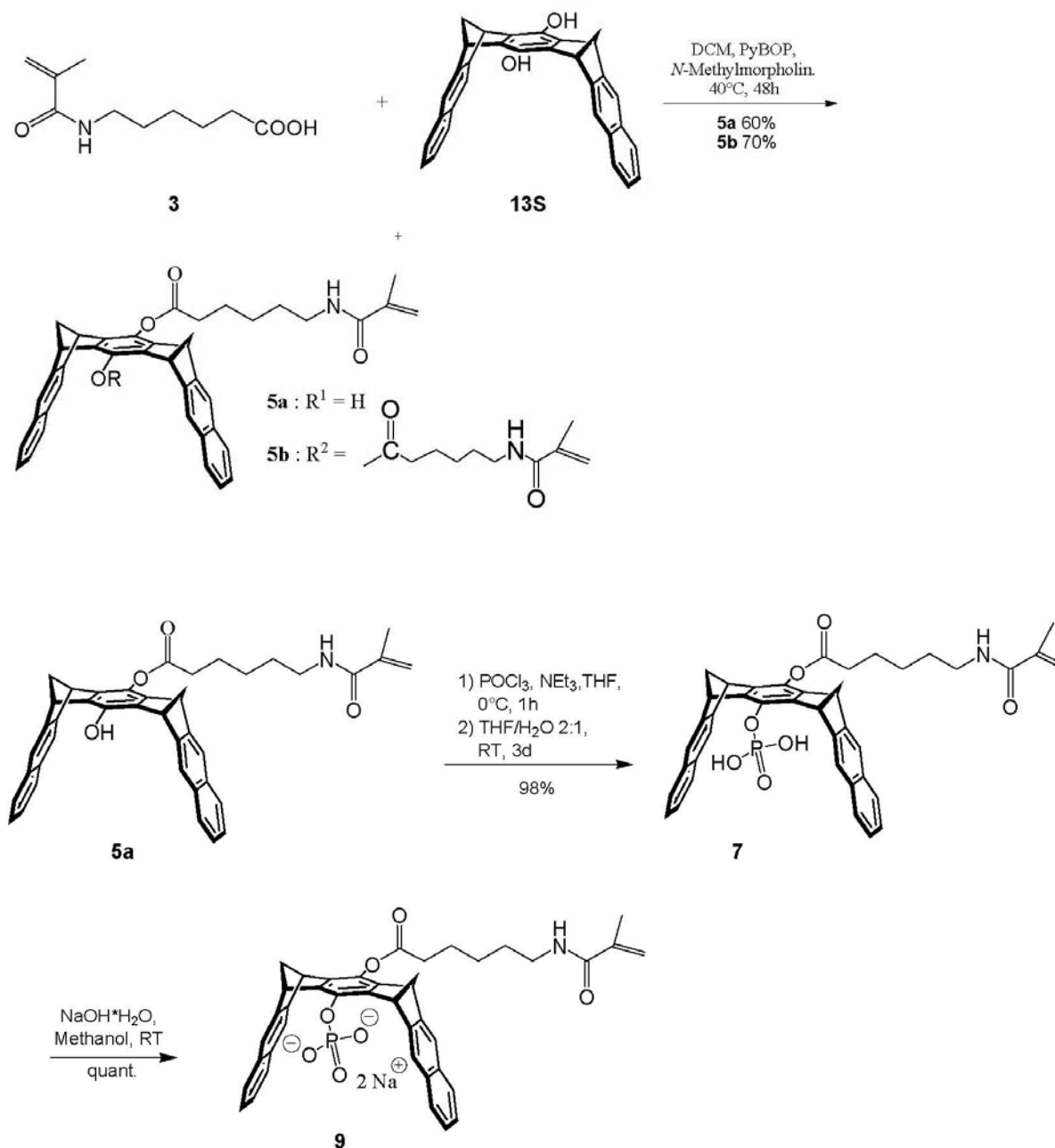


Abbildung 4.103: Synthesedes polymerisierfähigen Clips **9**.

Zuerst erfolgte die Synthese des *N*-Methacryloyl-6-aminocapronsäure-Linkers (**3**) nach der Patetentvorschrift US 66791.^[197] Danach wurden Methacrylsäureanhydrid (**1**) und 6-Amino-hexansäure (**2**) unter Aminolyse zur Amidverbindung **3** umgesetzt. Der zweite Reaktionsschritt beinhaltete die Veresterung von *N*-Methacryloyl-6-aminocapronsäure (**3**) und des Bis-Hydroxy-Tweezers **29S** in Gegenwart des Kupplungsreagenz PyBOP und der

Base *N*-Methylmorpholin unter Bildung eines Produktgemisches aus mono- und bisubstituierten Hydroxy-Tweezer **4a** und **4b**. Dieses Produktgemisch ließ sich säulenchromatographisch über Kieselgel sehr gut aufreinigen. Die Ausbeute an monosubstituiertem Hydroxy-Tweezer **4a** war dabei etwa doppelt so hoch wie die des Nebenproduktes **4b**. Es wurden mehrere Versuche unternommen die Ausbeute des gewünschten Produktes **4a** weiter zu erhöhen. Doch auch durch Zugabe eines großen Überschusses an Bis-Hydroxy-Tweezer **29S** konnte die Bildung des bisubstituierten Produktes **4b** nicht wesentlich verringert werden. Wie man den beiden in der Abbildung 4.104 dargestellten ^1H -NMR-Spektren entnehmen kann, erscheinen die Methylengruppen des monosubstituierten Tweezer-Seitenarms hochfeldverschoben. Dies deutet auf eine Eigenassoziation des Seitenarms durch den Tweezer **4a** hin. Warum diese hochfeldverschobenen Signale allerdings so breit erscheinen war zunächst unklar.

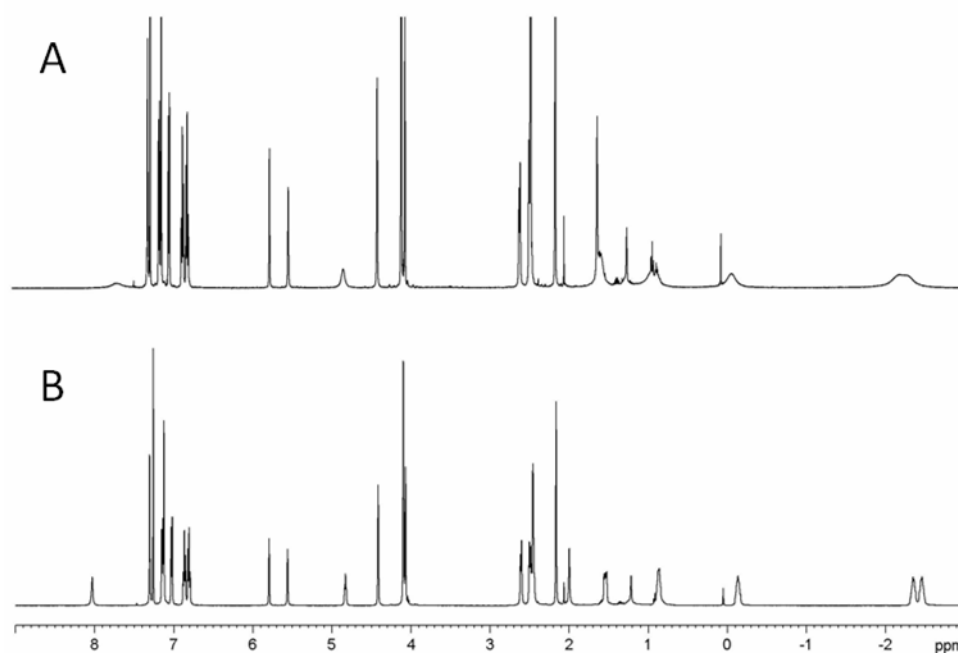


Abbildung 4.104: ^1H -NMR-Spektren des Hydroxy-Tweezers **4a** bei 298 K (A) und 248 K (B).

Falls die Breite der Signale auf dynamische Effekte zurückgeführt werden könnten, sollten die Signale mit abnehmender Temperatur zunehmend schärfer werden. Bei Tieftemperatur-Messungen müsste die Rotation der Alkylkette deutlich langsamer werden und letztendlich „einfrieren“. Genau dieses Phänomen lässt sich in den beiden ^1H -NMR-Spektren beobachten. Die bei 298 K beobachteten breiten Signale der Alkylgruppen erscheinen bei 248 K deutlich schärfer. Dies gilt auch für die beiden breiten Signale der OH- und NH-Gruppen. Die

verbreiterten Signale der inkludierten Alkylgruppen sind also auf dynamische Effekte der Alkylkette innerhalb der Kavität des Tweezers aufgrund der leicht rotierbaren sp^3 -hybridisierten CH_2 -Gruppen zurückzuführen. Bei 248 K wird diese Rotation regelrecht „eingefroren“ und es resultieren scharfe Signale. Des Weiteren konnte ein Lösungsmittelleffekt bzgl. der Inkludierung des Tweezer-Seitenarms festgestellt werden. Während im deuterierten Chloroform die Signale der Methylengruppen hochfeldverschoben erschienen, konnte in deuteriertem DMSO keine Eigenassoziation mehr beobachtet werden. Der Grund dafür ist, dass der Tweezer **4a** DMSO-Moleküle als Gäste komplexiert und folglich die Kavität für den Tweezer Seitenarm nicht mehr zugänglich ist. Diese beiden Strukturen, die in den jeweiligen Lösungsmitteln beobachtet werden konnten, wurden mit Hilfe des Programms Spartan '04 energieminiert berechnet. Ihre energieminierten Strukturen sind in der Abbildung 4.105 dargestellt.

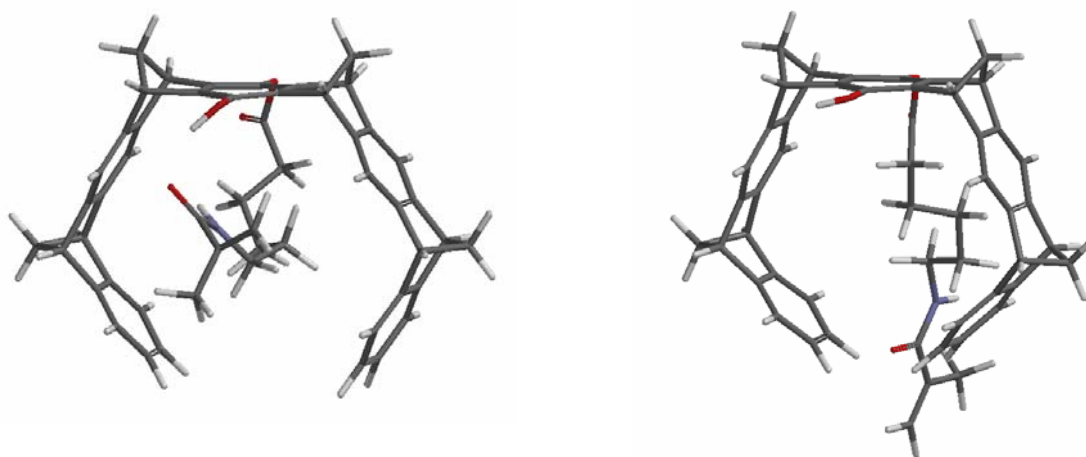


Abbildung 4.105: Energieminimierte Strukturformeln des Hydroxy-Tweezers **4a** (Spartan '04, Gasphase). Links: In $CDCl_3$ findet eine Eigenassoziation des Tweezer-Seitenarms statt. Rechts: In dem Lösungsmittel DMSO erfolgt dagegen keine Eigenassoziation, da die Kavität des Tweezers durch die Gastmoleküle DMSO besetzt ist.

Die gleiche Veresterung wurde auch mit dem Bis-Hydroxy-Clip **13S** durchgeführt. Wie zuvor wurde auch hier ein Produktgemisch bestehend aus mono- und bisubstituierten Clip **5a** und **5b** erhalten. Im Gegensatz zum Tweezer war die Ausbeute an gewünschtem monosubstituiertem Clip **5a** geringer als die des Nebenproduktes **5b**. Allerdings konnte auch in diesem Fall keine Optimierung bzgl. der Ausbeute an **5a** erreicht werden. Im Gegensatz zum Hydroxy-Tweezer **4a** ließen sich für den monosubstituierten Hydroxy-Clip **5a** mittels Diffusions-kristallisation Kristalle züchten. Diese konnten anschließend röntgenspektroskopisch vermessen werden. Wie man der Kristallstruktur in Abbildung 6.48

entnehmen kann wird das Lösungsmittel THF in der Kavität des Clips komplexiert. Die in beiden Reaktionen als Nebenprodukte entstandenen Bisaddukte **4b** und **5b** wurden zunächst aufbewahrt. Diese sollten später aufgrund ihrer beiden funktionellen Methacrylsäure-Gruppen als Crosslinker eingesetzt werden. Der dritte Reaktionsschritt beinhaltete die Phosphorylierung des Hydroxy-Tweezers **4a**. Die Durchführung der Mono-Phosphorylierung erfolgte analog zu der der Bis-Phosphorylierung mit dem Phosphorylierungsreagenz Phosphoroxychlorid in Gegenwart der Base Triethylamin. Um eine vollständige Phosphorylierung gewährleisten zu können, mussten in diesem Fall allerdings 22 eq Phosphoroxychlorid und 5.4 eq Triethylamin bzgl. dem Tweezer **4a** eingesetzt werden. Bei der Bisphosphorylierung des Tweezers **29S** waren dagegen lediglich 14 eq Phosphoroxychlorid und 2.7 eq Triethylamin erforderlich. Dieser große Überschuss an Phosphorylierungsreagenz im Fall des Tweezers **4a** könnte vielleicht darauf zurückzuführen sein, dass hier im Gegensatz zum Bis-Hydroxy-Tweezer **29S** die Hydroxygruppe aufgrund sterischer Hinderung durch den Methacryl-Linker schwerer zugänglich ist. Die Phosphorylierung des Hydroxy-Clips **5a** erfolgte analog zu der des Tweezers **4a**. Allerdings konnte hier eine vollständige Monophosphorylierung bereits mit deutlich geringen Mengen an Phosphorylierungsreagenz erzielt werden. Im Fall des Clips **4a** waren lediglich 13.7 eq Phosphoroxychlorid und 4.8 eq Triethylamin erforderlich. (Tabelle 4.18)

	POCl₃	NEt₃
Tweezer 29S	14 eq	2.7 eq
Tweezer 4a	22 eq	5.4 eq
Clip 13S	14 eq	2.7 eq
Clip 5a	13.7 eq	4.8 eq

Tabelle 4.18: Übersicht der für die Phosphorylierung benötigten Konzentrationen an Phosphorylierungsreagenz und Base.

Diese Beobachtung widerspricht allerdings der Vermutung, dass der große Überschuss an Phosphorylierungsreagenz im Fall des Tweezers **4a** allein auf die sterische Hinderung der Hydroxygruppe durch den Methacryl-Linker zurückzuführen ist. Sowohl der Hydroxy-Tweezer **4a** als auch der Hydroxy-Clip **5a** tragen den gleichen Substituenten an ihrer zentralen Benzol-„Spacereinheit“. Es muss also einen anderen Grund für das unterschiedliche Verhalten von Clip und Tweezer bzgl. der Phosphorylierung geben. Vielleicht könnte die Größe und Form des Tweezers im Gegensatz zum Clip ebenfalls zu einer erschwerten Phosphorylierung der Hydroxygruppe beitragen. Im letzten Syntheseschritt erfolgte in beiden

Fällen die Neutralisierung durch Zugabe von Natriumhydroxid-Monohydrat unter Bildung der entsprechenden Bisnatrium-Salze **8** und **9**.

4.5.1.3 Komplexeigenschaften des polymerisierbaren Tweezers **8 und Clips **9****

Bevor die beiden neuen unsymmetrischen Verbindungen **8** und **9** auf ihre Polymerisierfähigkeit hin untersucht wurden, sollten zunächst ihre Bindungskonstanten mittels Fluoreszenz- und ^1H -NMR-Verdünnungstitration bestimmt werden. Nur unter der Voraussetzung, dass beide monosubstituierten Verbindungen, Tweezer **8** und Clip **9**, trotz des Verlustes der zweiten Phosphatgruppe immer noch Komplexeigenschaften gegenüber basischen Aminosäuren bzw. elektronenarmen aromatischen Gästen aufweisen, wäre ihre Polymerisierung sinnvoll. Als Gäste sollten dabei für Tweezer **8** wieder das geschützte Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe und für Clip **9** das Nukleotid NAD^+ untersucht werden. Bevor die Bindungskonstanten beider Verbindungen Tweezer **8** und Clip **9** mittels Fluoreszenztitration bestimmt werden konnten, mussten zunächst ihre Absorptionsspektren aufgenommen werden. Wie man der Abbildung 4.106 entnehmen kann, ergibt sich für den Tweezer **8** ein Absorptionsmaximum bei 284 nm und für den Clip **9** ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Titrationen wurden sowohl im gepufferten System ($\text{pH} = 7.64$) als auch in Methanol durchgeführt. Die ermittelten K_a -Werte sind der Tabelle 4.19 zu entnehmen.

UV/Vis-Spektren der polymerisierbaren Verbindungen **8 und **9****

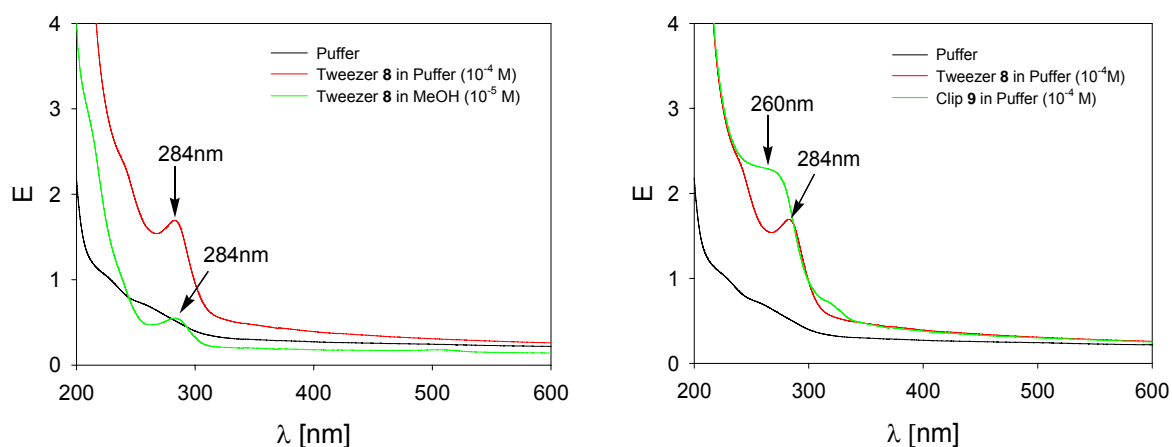


Abbildung 4.106: UV/Vis-Spektren des Tweezers **8** und Clips **9** in Puffer und in Methanol.

	Medium	K_a [M^{-1}]
8 + Ac-Lys-OMe	Phosphat-Puffer pH = 7.64	14000
9 + NAD⁺		33000
8 + Ac-Lys-OMe	Methanol	4000
9 + NAD⁺		7000

Tabelle 4.19: Übersicht der mittels Fluoreszenztitration ermittelten Bindungskonstanten für Tweezer **8** und Clip **9**.

Anschließend wurden die Bindungskonstanten mittels 1H -NMR-Verdünnungstitration bestimmt. Im Fall des Tweezers **8** musste die Titration in deuteriertem Methanol durchgeführt werden, da dieser nur schlecht wasserlöslich war. Clip **9** zeigte dagegen eine deutlich höhere Wasserlöslichkeit. Daher konnten beide Titrations im gepufferten System durchgeführt werden. Im Fall des Tweezers **8** erschienen die Signale der komplexierten Gastprotonen bei Raumtemperatur sehr breit hochfeldverschoben. Wie bereits zuvor im Fall des Hydroxy-Tweezers **4a** konnte auch hier mittels Tieftemperaturmessungen eine Signalverschärfung der hochfeldverschobenen Gast-Protonen erzielt werden. Dabei erwies sich für den Tweezer **8** eine Temperatur von 223 K als besonders geeignet. Allerdings konnten unter diesen Bedingungen trotz unterschiedlicher Gast-Konzentrationen keine signifikanten Signalverschiebungen beobachtet werden. Es scheint so, als wäre der Komplex bei 223 K regelrecht „eingefroren“. Daher musste die Auswertung der 1H -NMR-Verdünnungstitration bei 298 K erfolgen. Aufgrund der Signalverbreiterung ließen sich nur zwei Signale verfolgen und zwar die von H-G3 und H-G9.

Die ermittelten Bindungskonstanten K_a und $\Delta\delta_{\max}$ -Werte sind in der Tabelle 4.20 zusammengefasst:

	K_a [M^{-1}]	$\Delta\delta_{\max}$
G3	3600	0.388
G9	2500	0.251
Mittelwert	3000	

Tabelle 4.20: Übersicht der mittels 1H -NMR-Verdünnungstitration ermittelten Bindungskonstanten K_a und $\Delta\delta_{\max}$ -Werte der einzelnen Gastprotonen des Komplexes **8@Ac-LysOMe**.

Als nächstes wurde die ^1H -NMR-Verdünnungstitration von Clip **9** mit dem Gast NAD^+ durchgeführt. Dabei zeigte Clip **9** in deuteriertem Wasser sehr breite Protonensignale. Diese wurden allerdings sofort nach Zugabe des Gastes aufgrund der daraus resultierenden Komplexbildung deutlich schärfer. Im Gegensatz zum Tweezer **8** konnten für den Clip **9** mehrere Protonensignale verfolgt werden: H-G1, H-G1A, H-G2, H-G2A, H-G6 und H-G8A. Die ermittelten Bindungskonstanten K_a und $\Delta\delta_{\text{max}}$ -Werte sind in der Tabelle 4.21 aufgeführt:

	$K_a [\text{M}^{-1}]$	$\Delta\delta_{\text{max}}$
G1	15300	0.232
G1A	5500	0.469
G2	9000	1.14
G2A	5800	0.29
G6	8800	1.187
G8A	4800	0.609
Mittelwert	6800	

Tabelle 4.21 : Übersicht der mittels ^1H -NMR-Verdünnungstitration ermittelten Bindungskonstanten K_a und $\Delta\delta_{\text{max}}$ -Werte der einzelnen Gastprotonen des Komplexes **9@NAD⁺**.

Wie man der Tabelle 4.22 entnehmen kann, stimmen die mit der ^1H -NMR-Verdünnungstitration ermittelten Bindungskonstanten K_a recht gut mit denen der Fluoreszenztitration überein.

	$K_a [\text{M}^{-1}]$ ^1H-NMR-Verdünnungstitration	$K_a [\text{M}^{-1}]$ Fluoreszenztitration
8 + Ac-Lys-OMe	3000	4000
9 + NAD⁺	7000	33000

Tabelle 4.22: Übersicht der mittels ^1H -NMR-Verdünnungstitration und Fluoreszenztitration ermittelten Bindungskonstanten K_a der Komplexe **8@Ac-Lys-OMe** und **9@NAD⁺**.

Nachdem mittels ^1H -NMR-Verdünnungstitrationen und Fluoreszenztitrationen eindeutig bewiesen werden konnte, dass beide Rezeptormoleküle auch unter Verlust einer Phosphatgruppe an ihrer zentralen Benzol-„Spacereinheit“ ihre jeweiligen Gastmoleküle immer noch recht effektiv binden können, sollte als nächstes die Polymerisierung dieser

versucht werden. Dazu sollten sowohl die monosubstituierten als auch die bisubstituierten Verbindungen als Monomere herangezogen werden. Die bisubstituierten Verbindungen fanden dabei, wie zuvor erwähnt, als Crosslinker Einsatz. Es wurden insgesamt drei unterschiedliche Polymerisierungsansätze durchgeführt. Als Radikalstarter wurde entweder Ammoniumpersulfat (APS) oder Azoisobutyronitril (AIBN) verwendet. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit wurden die Monomere Glucoseacrylamid **1P** und Aminoalkohol **2P** eingesetzt. Als Fluoreszenzsonde diente im dritten Ansatz Dansylacrylamid **3P** als Monomer. Der erste Polymerisationsversuch wurde von W. Sun an der Universität Dortmund durchgeführt.^[198, 199] Dabei wurden die beiden Crosslinker **4b** und **5b** sowie Tweezer **8** und Clip **9** jeweils mit dem Monomer **1P** in Gegenwart des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) und dem Polymerisierungskatalysator *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TMEDA) zur Reaktion gebracht. Wie aus den ¹H-NMR-Spektren hervorging, hatte in allen vier Fällen keine Copolymerisation stattgefunden. Bei den erhaltenen weißen Feststoffen handelte es sich jeweils um ein Gemisch aus den vier Monomeren **4b**, **5b**, **8** bzw. **9** und dem Monomer **1P**. Abbildung 4.107 zeigt eine Übersicht der geplanten Copolymere.

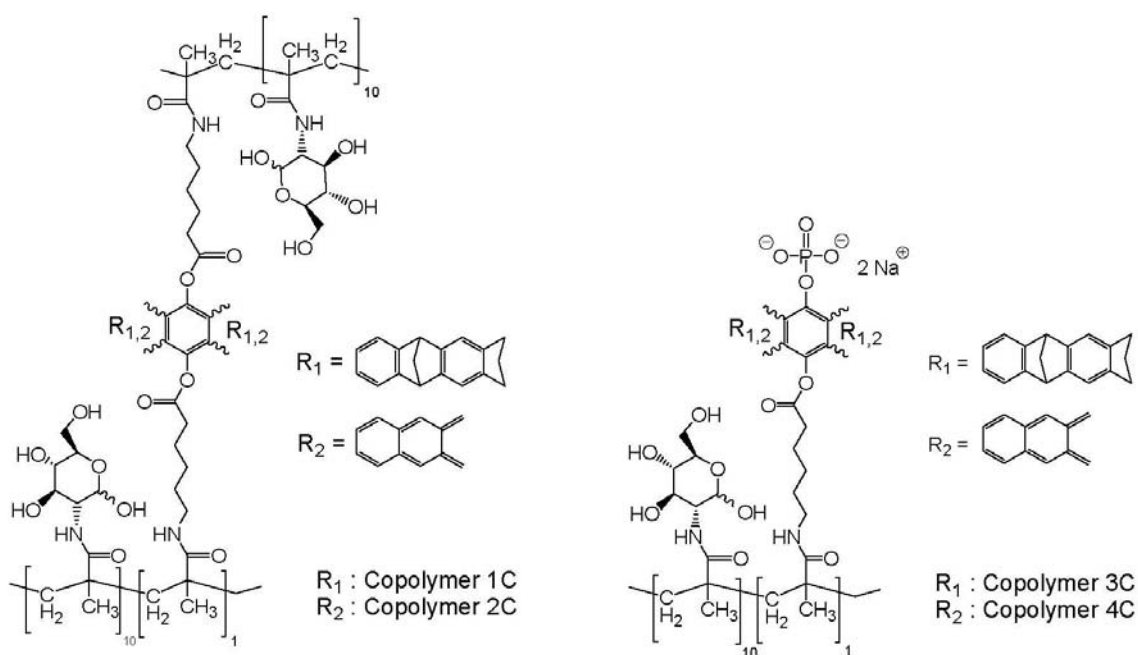


Abbildung 4.107: Übersicht der geplanten Copolymere **1C** – **4C** beim ersten Polymerisationsversuch.

In einem zweiten Versuch wurde die Polymerisation unter anderen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Zwar wurden hier ebenfalls Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TMEDA) als Hilfsbase (Polymerisierungskatalysator) eingesetzt, allerdings in höheren Konzentrationen. Die Reaktionszeit wurde ebenfalls auf 24 h begrenzt. Des Weiteren wurde ein anderes Monomer eingesetzt. Statt Glucoseacrylamid **1P** kam hier der Aminoalkohol **2P** zum Einsatz. Die geplanten Copolymere sind in der Abbildung 4.108 dargestellt. ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigten auch in diesem Fall, dass keine Copolymerisation stattgefunden hat.

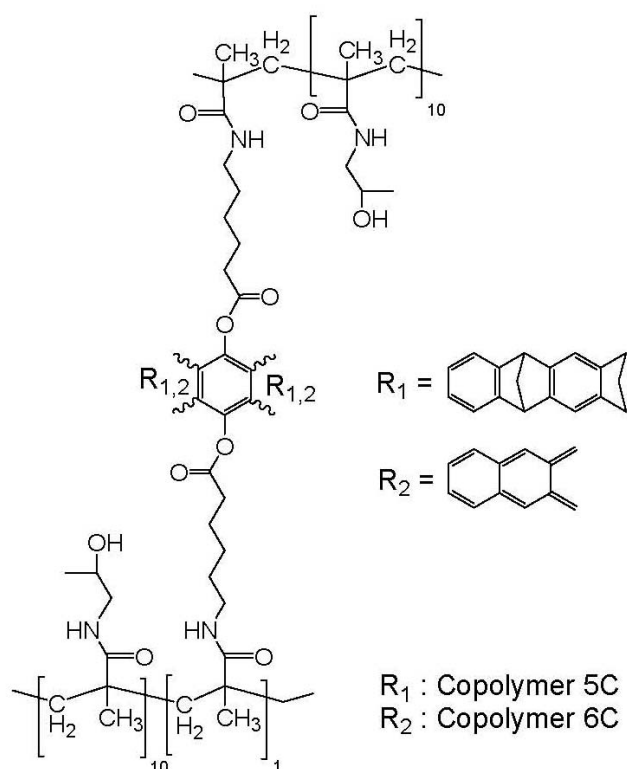


Abbildung 4.108: Übersicht der geplanten Copolymere **5C** und **6C** beim zweiten Polymerisationsversuch.

In einem letzten Versuch wurde die Polymerisation in Gegenwart des Radikalstarters Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) durchgeführt. Abbildung 4.109 zeigt die geplanten Copolymere. Als wasserlösliche Monomere dienten hier Glucoseacrylamid **1P** und Dansylacrylamid **3P**. Die Reaktion erfolgte 72 h lang bei 60 °C im Thermomixer. Im Gegensatz zu allen vorherigen Polymerisationsversuchen konnten hier verbreiterte Signale beobachtet werden. Dies war ein Zeichen dafür, dass eine Polymerisation stattgefunden haben muss. Anhand der ¹H-NMR-Spektren konnte allerdings nicht eindeutig geklärt werden, ob auch die beiden Monomeren **8** und **9** an der Polymerisation beteiligt waren. Die Spektren zeigten lediglich verbreiterte

Signale der beiden wasserlöslichen Monomere Glucoseacrylamid **1P** (0.5 - 4.5 ppm) und Dansylacrylamid **2P** (7.0 - 8.5 ppm). Allerdings waren die erhaltenen Polymere in nahezu allen Lösungsmitteln wie z. B. Wasser, DMSO, DMF und CDCl_3 unlöslich. Ihr Einsatz in Enzym-Assays als mögliche Enzyminhibitoren unter physiologischen Bedingungen ist damit hinfällig. Eine erfolgreiche Polymerisation hätte dagegen aufgrund des großen Überschusses an Glucosemonomer **1P** zu einer deutlichen Steigerung der Wasserlöslichkeit beitragen müssen.

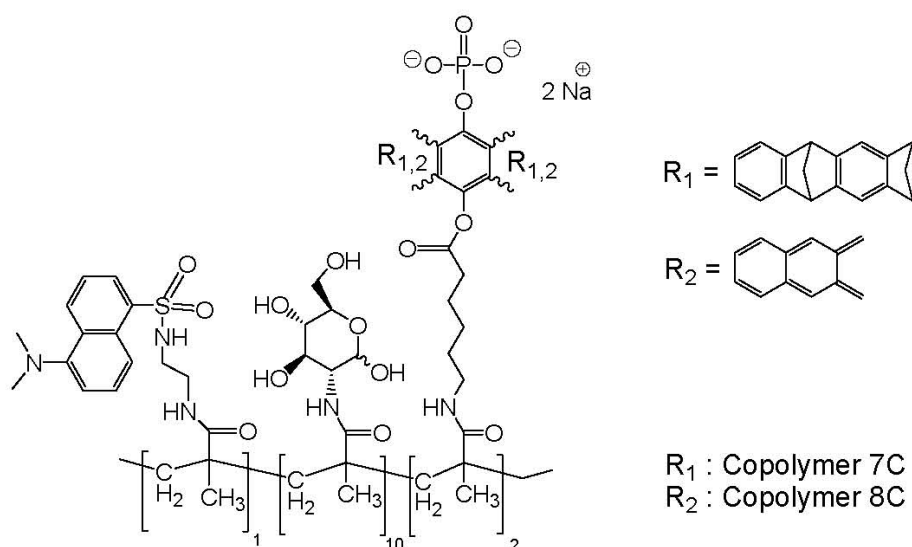


Abbildung 4.109: Übersicht der geplanten Copolymere **7C** und **8C** beim dritten Polymerisationsversuch.

4.5.2 Synthese des fluoreszenzmarkierten Tweezers 29 und Clips 30

Nach der erfolglosen Polymerisation der beiden polymerisierfähigen Rezeptormoleküle, sollten in einem letzten Projekt dieser Doktorarbeit fluoreszenzmarkierte Tweezer und Clips synthetisiert werden. Mit ihrer Hilfe sollten sich in Zellkulturen die unterschiedlichen inhibitorischen Wirkungsweisen beider Rezeptorklassen verfolgen und letztendlich aufklären lassen. Dies ist insbesondere für die Aufklärung der effektiven Hemmwirkung des Tweezers **750** gegenüber dem für die Alzheimer-Krankheit verantwortlichen Peptid $A\beta(1-42)$ im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit G. Bitan aus Los Angeles von entscheidendem Interesse. Die Einführung einer Fluoreszenzsonde über einen Linker bedeutet allerdings, genauso wie bei dem zuvor eingeführten Methacryl-Linker in die zentrale Benzol-, „Spacereinheit“ der polymerisierfähigen Rezeptormoleküle, gleichzeitig den Verlust einer der beiden wasserlöslichen Phosphatgruppen. Wie allerdings anhand der ^1H -NMR-Verdünnungs- und Fluoreszenztitrationen des polymerisierfähigen Tweezers **8** und Clips **9** mit den entsprechenden Gastmolekülen eindeutig bewiesen werden konnte, waren ihre Komplexeigenschaften von diesem Verlust nicht betroffen. Beide monophosphorylierten Rezeptoren **8** und **9** waren immer noch in der Lage geeignete Substratmoleküle effektiv in ihrer Kavität zu komplexieren. Die Bindungskonstante beträgt z. B. für den Komplex zwischen dem polymerisierfähigen Tweezer **8** und dem geschützten Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe in Methanol etwa 3000 M^{-1} . Im Puffer wäre eine noch höhere Bindungskonstante zu erwarten gewesen. Allerdings konnte dies aufgrund der zu geringen Wasserlöslichkeit des polymerisierfähigen Tweezers, die auf den Verlust der Phosphatgruppe zurückzuführen ist, nicht überprüft werden. Der monophosphorylierte Clip **9** zeigte dagegen eine weitaus höhere Wasserlöslichkeit, so dass die ^1H -NMR-Verdünnungs- und Fluoreszenztitrationen mit dem Pyridiniumsalz NAD^+ im Puffer bei $\text{pH} = 7.64$ durchgeführt werden konnten. Für den Komplex ergab sich dabei eine Bindungskonstante K_a von etwa 7000 M^{-1} . Da die beiden polymerisierfähigen Rezeptormoleküle trotz des Verlustes einer Phosphatgruppe eine recht hohe Affinität gegenüber ihren Gastmolekülen zeigten, sollte dies auch für die entsprechenden monophosphorylierten Fluoreszenzsonden zutreffen. Als Linker zwischen Rezeptor und Sonde diente die Z-geschützte Triethylenglykolsäure. Die Einführung der Sonde sollte im letzten Syntheseschritt erfolgen, um deren Ausbleichen über die einzelnen Synthesestufen hinweg zu vermeiden. Ein weiterer Vorteil, die Sonde erst zum Schluss an die zentrale Benzol-, „Spacereinheit“ des Tweezers einzuführen bestand ferner darin, dass sich in relativ kurzer Zeit und mit geringem Syntheseaufwand möglichst viele Fluoreszenzsonden

testen lassen. Mit dieser Art „Screening“ sollte sich die für die anschließenden Untersuchungen am besten geeignete Sonde schnell finden lassen. Ferner sollte darauf geachtet werden, dass die Emission der Fluoreszenzsonde im Bereich zwischen 400 bis 600 nm liegt, so dass sich ihr Emissionsspektrum nicht mit dem des Tweezers und dem der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan überschneidet. Sowohl der Tweezer als auch Tryptophan besitzt bei 280 nm ein Absorptionsmaximum und emittiert bei 340 nm. Daher sollte zunächst Fluoresceinisothiocyanat (FITC) als Sonde eingeführt werden. FITC weist bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm eine Emission von 518 nm auf.

Zuerst erfolgte die Synthese des Z-geschützten Triethylenglykol-Linkers (TEG-Linker) nach Vorschrift von J. März-Berberich und J. Polkowska. Die beiden folgenden Abbildungen 4.110 und 4.111 zeigen die anschließenden Synthesestufen zur Darstellung des fluoreszenzfähigen Tweezers **15** und Clips **16**. Nach der Synthese des Z-geschützten TEG-Linkers **4L** wurde dieser mit dem Bis-Hydroxy-Tweezer **29S** verestert. Die Durchführung erfolgte analog zu der des polymerisierfähigen Tweezers **8**. Auch hier wurde wieder ein Produktgemisch aus mono- und bisubstituiertem Hydroxy-Tweezer **11a** und **11b** erhalten. Im Gegensatz zum polymerisierfähigen Tweezer wurde hier allerdings nur das monosubstituierte Produkt **11a** isoliert. Im Fall des polymerisierbaren Tweezers konnte dagegen das bisubstituierte Nebenprodukt **4b** als Crosslinker weiter verwendet werden. Eine solche Einsatzmöglichkeit war hier für das bisubstituierte Nebenprodukt **11b** nicht gegeben. Des Weiteren konnte im Gegensatz zum monosubstituierten Hydroxy-Tweezer **4b** keine Eigenassoziation des Tweezer **11a**-Seitenarms beobachtet werden. Wie man den ¹H-NMR-Spektren im Anhang entnehmen kann, erscheinen die Methylengruppen dieses Tweezer-Seitenarms (TEG-Linker) im Gegensatz zu dem des polymerisierfähigen Tweezer-Seitenarms (Methacrylsäure) nicht hochfeldverschoben. Wie man der Syntheseübersicht in Abbildung 4.111 entnehmen kann, erfolgte die Veresterung des Z-geschützten Triethylenglykol-Linkers **4L** mit dem Bis-Hydroxy-Clip **13S** analog zum Tweezer. Die Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Tweezers **11a** erfolgte ebenfalls analog zu der des polymerisierfähigen Tweezers **8**. Auch hier war ein großer Überschuss an Phosphoroxychlorid erforderlich. Um eine vollständige Phosphorylierung zu erzielen, mussten 20.4 eq Phosphoroxychlorid und 5.2 eq Triethylamin eingesetzt werden. Gleiches galt dieses Mal auch für den monosubstituierten Hydroxy-Clip **12a**. Nur in Anwesenheit von 20 eq Phosphoroxychlorid und 5 eq Triethylamin konnte eine vollständige Phosphorylierung gewährleistet werden. Bevor entsprechende

Fluoreszenzsonden an den Tweezer **13** bzw. Clip **14** gekoppelt werden konnten, musste zuvor noch die Z-Schutzgruppe entfernt werden, um die freie Aminofunktion wieder zu erlangen. Die Abspaltung der Z-Schutzgruppe erfolgte durch Hydrierung in Gegenwart des Katalysators Pd/C. Im Gegensatz zum Tweezer **13** konnte Clip **14** unter gleichen Bedingungen nicht entschützt werden. Eine plausible Erklärung hierfür konnte allerdings nicht gefunden werden.

4.5.2.1 Syntheseübersicht des Tweezers 15

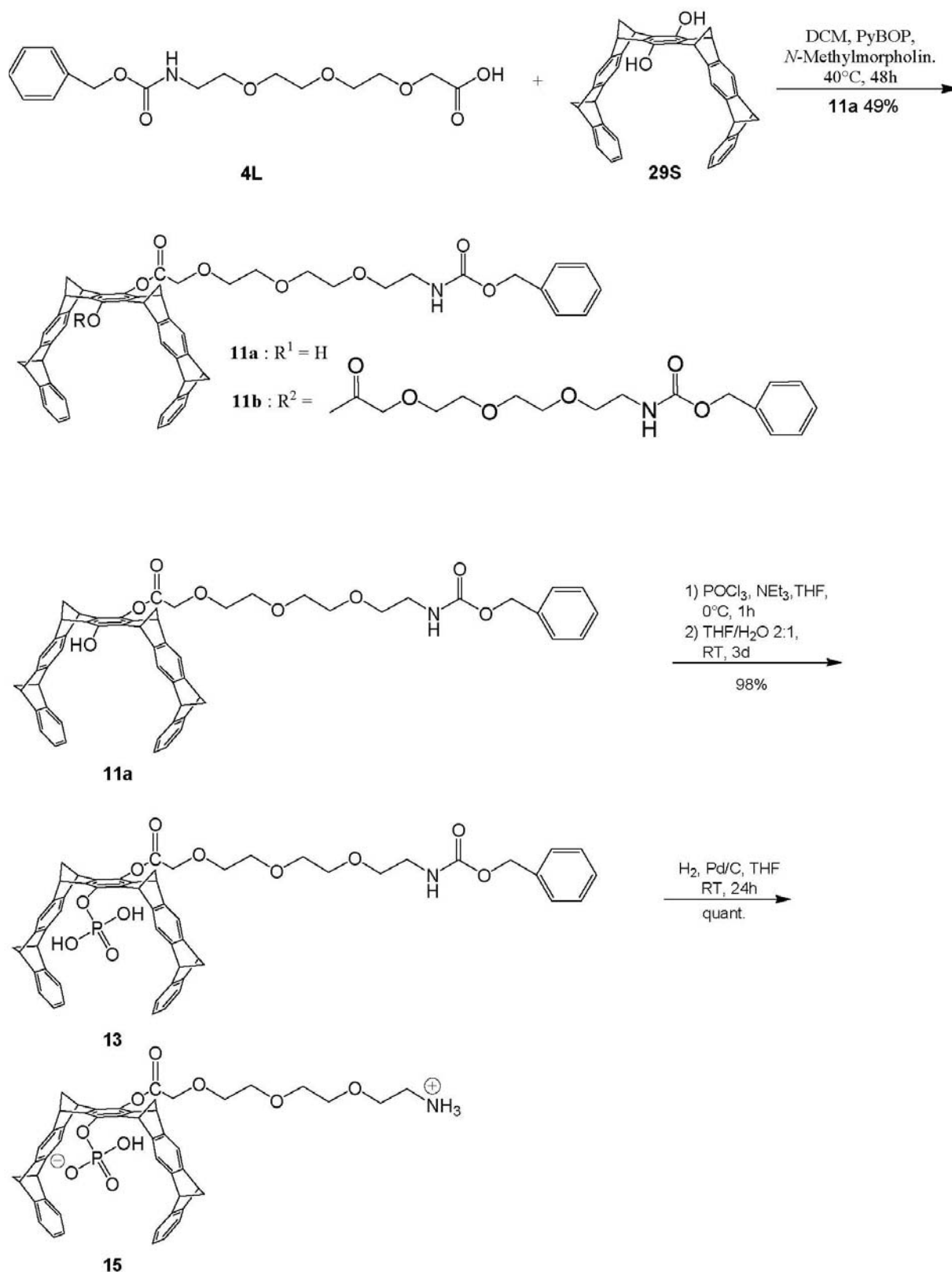


Abbildung 4.110: Erste Syntheseroute zur Darstellung fluoreszenzmarkierter Tweezer.

4.5.2.2 Syntheseübersicht des Clips 17

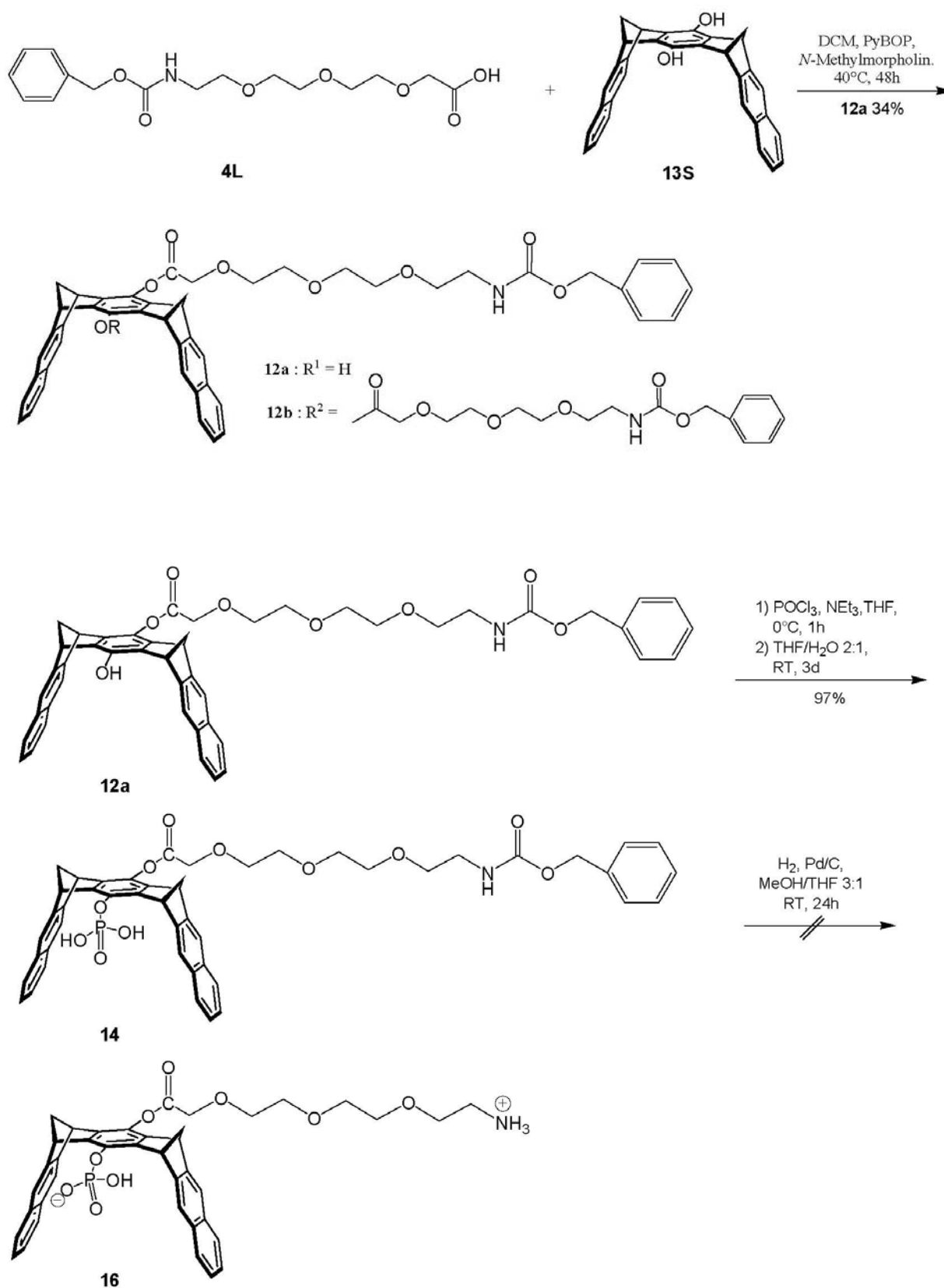


Abbildung 4.111: Erste Syntheseroute zur Darstellung fluoreszenzmarkierter Clips.

Nachdem die Entschützung im Fall des Tweezers erfolgreich durchgeführt werden konnte, lag nun die freie Aminofunktion vor. An diese funktionelle Gruppe sollten nun verschiedene Fluoreszenzsonden, wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Dansylchlorid und Fluorescamin gekuppelt werden (Abbildung 4.112). All diese Versuche blieben allerdings ohne Erfolg. Das Scheitern dieser Kupplungsversuche könnte in der freien Phosphat-Gruppe des Tweezers begründet liegen.

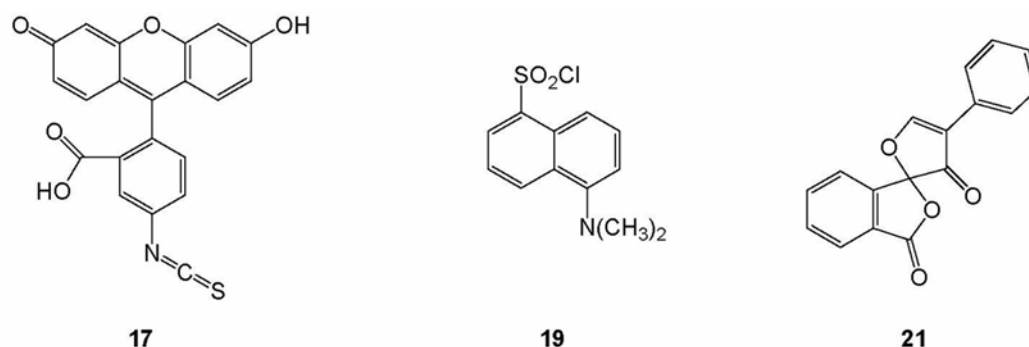


Abbildung 4.112: Übersicht der Fluoreszenzsonden. Fluoresceinisothiocyanat (**17**, λ_{ex} 492 nm; λ_{em} 518 nm), Dansylchlorid (**19**, λ_{ex} 337 nm; λ_{em} 492 nm) und Fluorescamin (**21**, λ_{ex} 390 nm; λ_{em} 475 nm).

Dieser Syntheseweg hatte sich damit als äußerst ungeeignet erwiesen, um die beiden Rezeptormoleküle mit Fluoreszenzsonden zu markieren. Daher musste nach einer neuen Synthesemethode gesucht werden, die die Einführung einer Fluoreszenzsonde ermöglichte. In diesem Zusammenhang gelang J. Polkowska die Synthese des Dansylmarkierten TEG-Linkers **24**. Allerdings war bei dieser Syntheseroute die Auswahl der Fluoreszenzsonden an eine Bedingung geknüpft. Nur solche Fluoreszenzsonden lassen sich in die Rezeptormoleküle einführen, die über keine zusätzlichen funktionellen Gruppen verfügen. Ansonsten könnten diese während der einzelnen Syntheseschritte zu unerwünschten Nebenprodukten führen. Im Gegensatz zu FITC, das noch über zwei zusätzliche funktionelle Gruppen, eine Hydroxy- und eine Carboxygruppe verfügt, die bei der Kupplung mit dem Hydroxy-Tweezer bzw. bei der anschließenden Phosphorylierung zu Problemen führen könnten, weist Dansylchlorid (**19**) keinerlei solcher Gruppen auf. Ähnliche Probleme wie mit FITC wären auch bei der Umsetzung mit Fluorescamin denkbar. Daher ist die Auswahl an Fluoreszenzsonden, die über diesen Syntheseweg eingeführt werden können, recht beschränkt. Zwei weitere Beispiele für Fluoreszenzsonden, deren Umsetzungen auf diese zweite Weise möglich wären, sind neben Dansylchlorid das wasserlösliche Hydroxypyrentrisulfonat (HPTS) als freie Säure (**4H**) sowie Carboxyrhodamin 110. In den beiden Abbildungen 4.113 und 4.114 sind die einzelnen Syntheseschritte des Dansylmarkierten Tweezers **29** und Clips **30** dargestellt.

Die Kupplung des Dansylmarkierten-TEG-Linkers **24** mit dem Bis-Hydroxy- Tweezer **29S** bzw. dem Bis-Hydroxy-Clip **13S** erfolgte analog zu der vorherigen. Auch hier wurde wieder ein Produktgemisch aus mono- und bisubstituiertem Tweezer bzw. Clip erhalten. Neben den gewünschten Produkten **25a** und **26a** wurden dieses Mal auch wieder die Nebenprodukte **25b** und **26b** isoliert, da diese eventuell später als Referenzverbindung nützlich sein könnten. Wie man den ^1H -NMR-Spektren im Anhang entnehmen kann, erscheinen zwei Methylengruppen des Tweezer **25a**-Seitenarms (Dansylmarkierter Glykol-Linker) im Gegensatz zu dem des normalen Glykol-Linkers aus dem ersten Syntheseweg leicht hochfeldverschoben. Es findet also im Lösungsmittel Chloroform wieder eine Eigenassoziation des Seitenarms durch den Tweezer **25a** statt, wie sie bereits zuvor beim polymerisierfähigen Tweezer **8** beobachtet werden konnte.

4.5.2.3 Syntheseübersicht des Tweezers 29

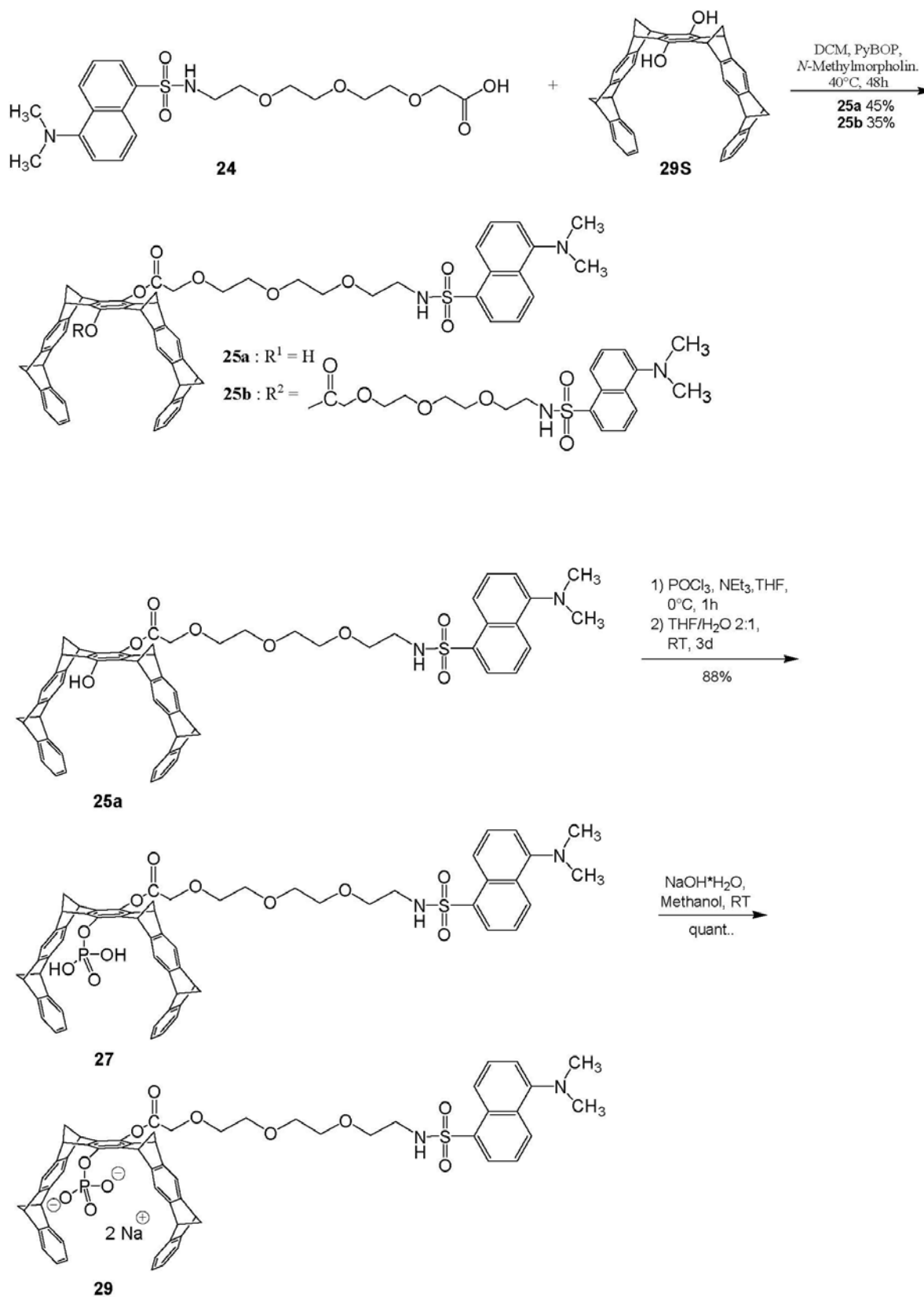
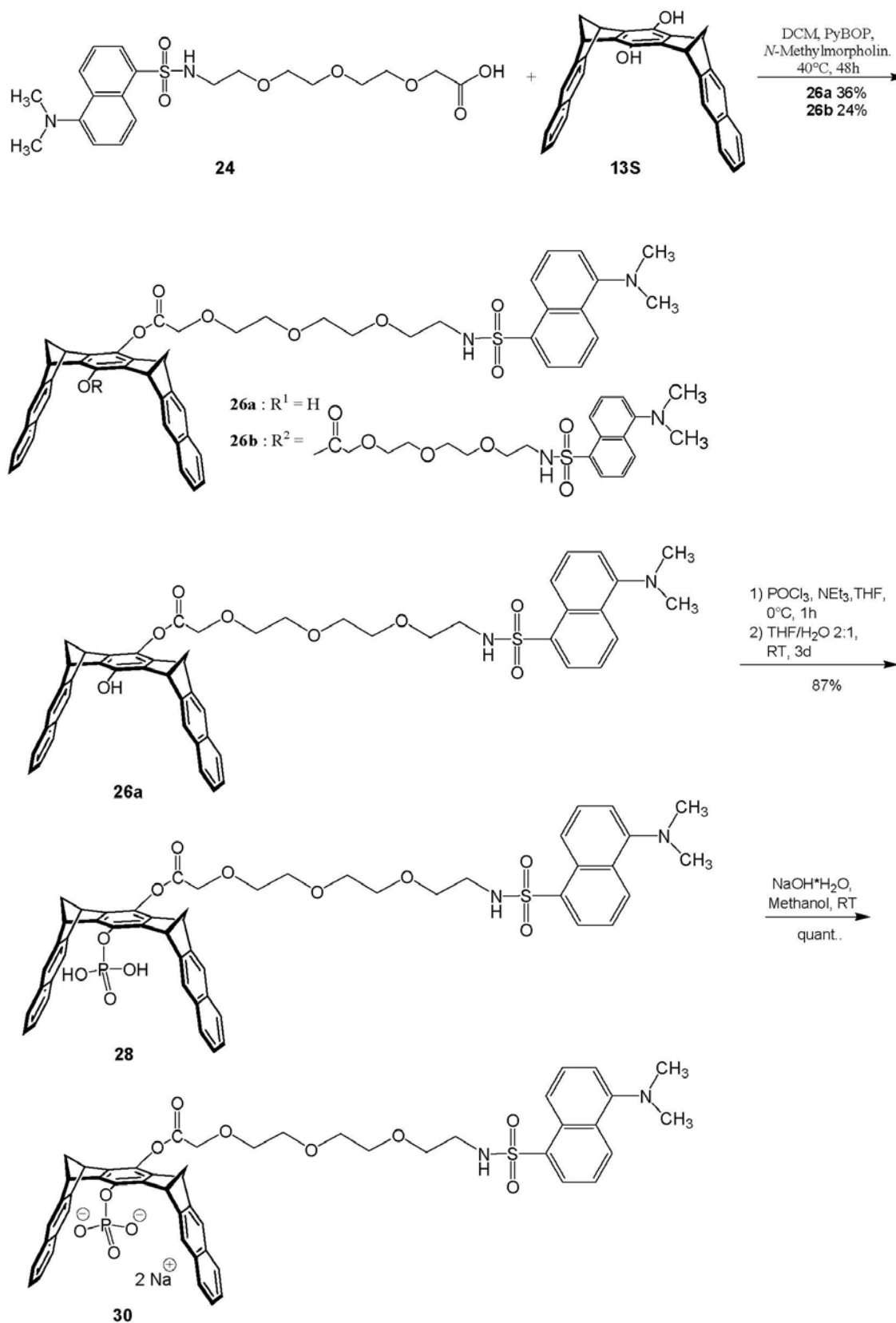


Abbildung 4.113: Zweite Syntheseroute zur Darstellung des Dansylmarkierten Tweezers 29.

Abbildung 4.114: Zweite Syntheseroute zur Darstellung des Dansylmarkierten Clips **30**.



Anschließend erfolgte wieder die Phosphorylierung des monosubstituierten Tweezers **25a** analog zu der vorherigen. Ein Versuch diesen großen Überschuss an POCl_3 von 20 eq auf 13 eq zu reduzieren scheiterte. Wie man dem in Abbildung 4.115 dargestellten ^1H -NMR-Spektrum entnehmen kann, hat die Phosphorylierung nur geringfügig zu etwa 10% stattgefunden. Auch die Massenspektren zeigten lediglich den Edukt-Peak und nicht den Produkt-Peak. Dieser große Überschuss an POCl_3 kann allerdings zur weiteren Phosphorylierung der bereits gebildeten Phosphatgruppe führen, so dass eine so genannte Pyrophosphat-Gruppe entsteht. Hinweise dafür lieferte das ^{31}P -NMR-Spektrum, das neben dem Produkt-Peak bei -5.5 ppm zwei Dubletts (-12.6, -17.3 ppm) aufweist, die für Pyrophosphate charakteristisch sind.^[200, 201]

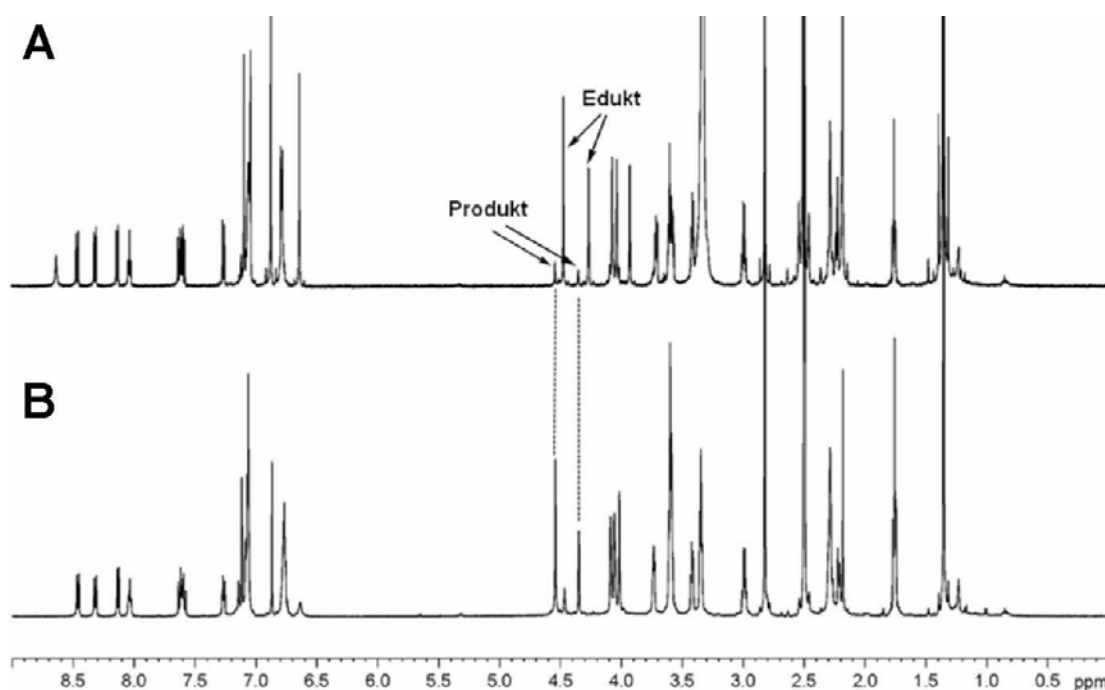


Abbildung 4.115: ^1H -NMR-Spektren des monophosphorylierten Tweezers **27** bei unterschiedlichen Mengen an Phosphorylierungsreagenz (A: 13 eq POCl_3 , B: 20 eq POCl_3).

Die Phosphorylierung des monosubstituierten Clips **26a** erfolgte analog zu der des Tweezers **25a**. Der letzte Reaktionsschritt beinhaltete wieder die Neutralisation des Tweezers **27** bzw. Clips **28** durch Zugabe von Natriumhydroxid-Monohydrat unter Bildung der entsprechenden Bisnatrium-Salze **29** und **30**. Wie sich herausstellte, war ein Überschuss an Natriumhydroxid-Monohydrat unbedingt zu vermeiden. Selbst ein geringer Überschuss an Natriumhydroxid-Monohydrat führte sofort zur Esterspaltung. In diesem Fall lag dann der monophosphorylierte Hydroxy-Tweezer **27** neben dem Dansylmarkierten-TEG-Linker **24** vor.

Dies konnte eindeutig mittels Massenspektroskopie, IR-Spektroskopie und NMR-Spektroskopie bewiesen werden. In den ESI-Spektren konnten sowohl die Peaks für den Dansyl-Linker als freie Säure (m/z $[M+H]^+$: ber. 441.1690, gef. 441.1710) und als Natrium-Salz (m/z $[M+Na]^+$: ber. 463.1509, gef. 463.1542), als auch die Peaks für den monophosphorylierten Tweezer als Mono- (m/z $[M+Na]^+$: ber. 669.1810, gef. 669.1829) und Bisnatrium-Salz (m/z $[M+2Na]^+$: ber. 691.1621, gef. 691.1656) detektiert werden. Das IR-Spektrum lieferte einen weiteren Hinweis für die eingetretene Esterspaltung. Im Gegensatz zur Vorstufe, dem monophosphorylierten Tweezer **27**, waren hier keine Esterbande mehr bei 1770 cm^{-1} zu sehen, sondern lediglich die Amidbande bei 1614 cm^{-1} . Das in Abbildung 4.116 dargestellte ^1H -NMR-Spektrum scheint dagegen auf den ersten Blick in Ordnung zu sein. Doch beim näheren Hinsehen fällt auf, dass das Signal für H-27 im Fall der Esterspaltung von 4.13 ppm nach 3.87 ppm hochfeldverschoben ist. Ferner konnte im ^{13}C -Spektrum ebenfalls kein Ester-C-Atom bei 168 ppm detektiert werden, sondern nur das C-Atom des Dansylmarkierten-TEG-Linkers als freie Säure **24** bei 181 ppm .

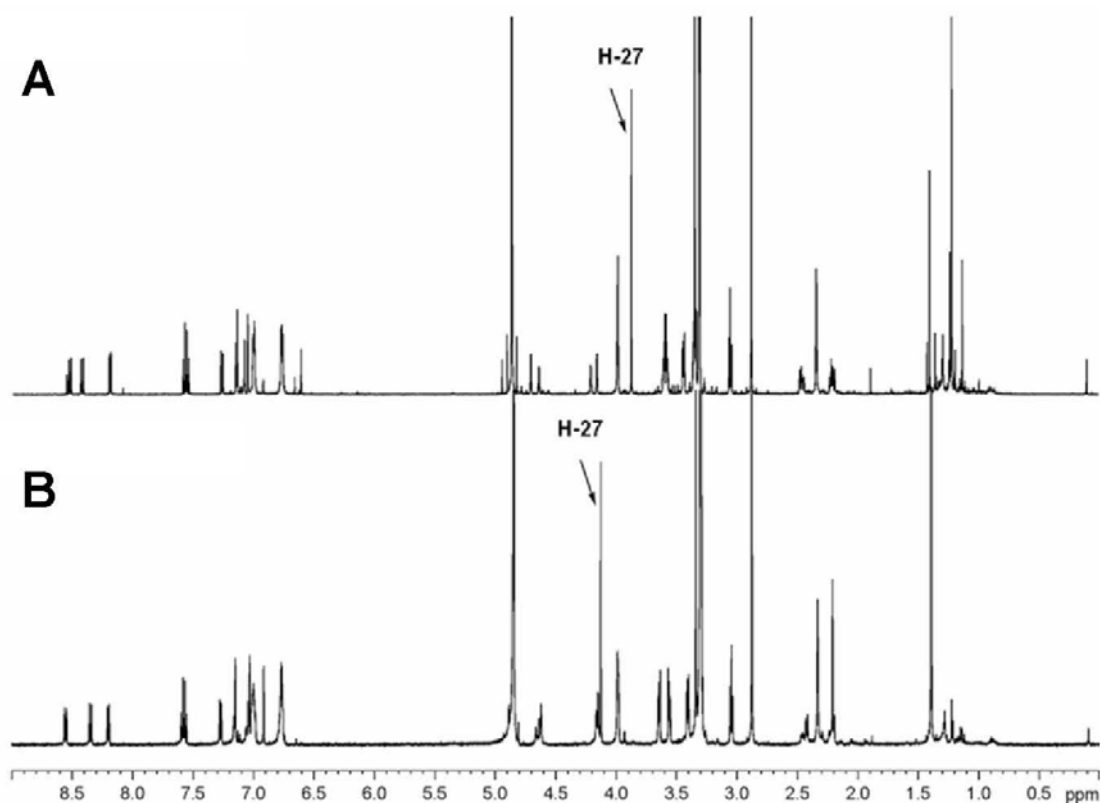


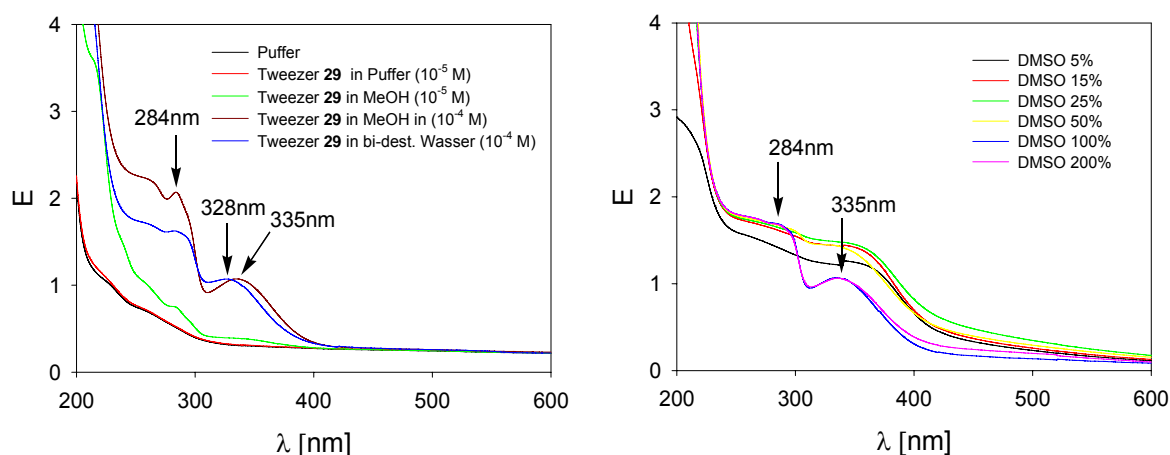
Abbildung 4.116: ^1H -NMR-Spektren des Esterspaltungsprodukts (A) sowie des Tweezers **29** als Bisnatriumsalz (B).

4.5.2.5 Komplexeigenschaften des fluoreszenzmarkierten Tweezers 29 und Clips

30

Bevor diese beiden neuen fluoreszenzmarkierten unsymmetrischen monophosphorylierten Rezeptormoleküle **29** und **30** in Zellkulturen eingesetzt werden können, müssen diese zunächst auf ihre Löslichkeit und Komplexeigenschaften hin untersucht werden. Ihre Bindungskonstanten sollten mittels Fluoreszenztitration in Puffer bei pH = 7.64 bestimmt werden. Dazu wurde zunächst ein Absorptionsspektrum beider Verbindungen aufgenommen. Wie man den UV/Vis-Spektren entnehmen kann, eignen sich nur Methanol und bi-dist. Wasser als Lösungsmittel. Im Puffer sind beide Verbindungen unlöslich. Daher wurde versucht, die Löslichkeiten des Tweezers **29** und Clips **30** im Puffer durch schrittweise Zugabe von DMSO zu erhöhen. Wie man der Abbildung 4.117 entnehmen kann, ist dies für den Tweezer **29** allerdings erst ab einem Verhältnis von DMSO/Puffer ≥ 1 möglich. Für Clip **30** konnte dagegen der gleiche Effekt bei einem Verhältnis DMSO/Puffer ≤ 1 erzielt werden. (Abbildung 4.118) Dieses Lösungsmittelverhältnis ist aber für die anstehenden klinischen Zellkulturexperimente fatal. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Ursache für die geringe Löslichkeit des Tweezers eventuell am zu hohen Salzgehalt des Puffers liegen könnte, oder ob der Tweezer an sich generell nicht wasserlöslich ist. Dazu wurde ein UV/Vis-Spektrum in bi-dist. Wasser aufgenommen. Wie man diesem Spektrum entnehmen kann, sind auch hier, wie bereits in Methanol, die charakteristischen Absorptionsbanden bei 284 nm für den Tweezer und bei 523 nm für die Dansyleinheit zu sehen. Die Fluoreszenztitrationen konnten daher sowohl in Methanol als auch in bi-dist. Wasser durchgeführt werden.

UV/Vis-Spektren der fluoreszenzmarkierten Verbindung 29



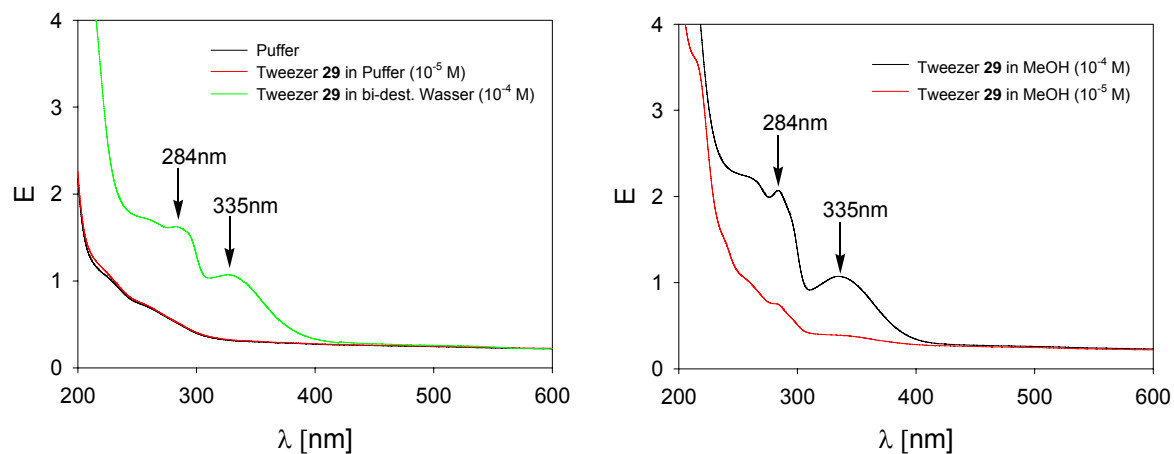


Abbildung 4.117: UV/Vis-Spektren des Tweezers **29** in Puffer, bi-dist. Wasser und Methanol.

UV/Vis-Spektren der fluoreszenzmarkierten Verbindung 30

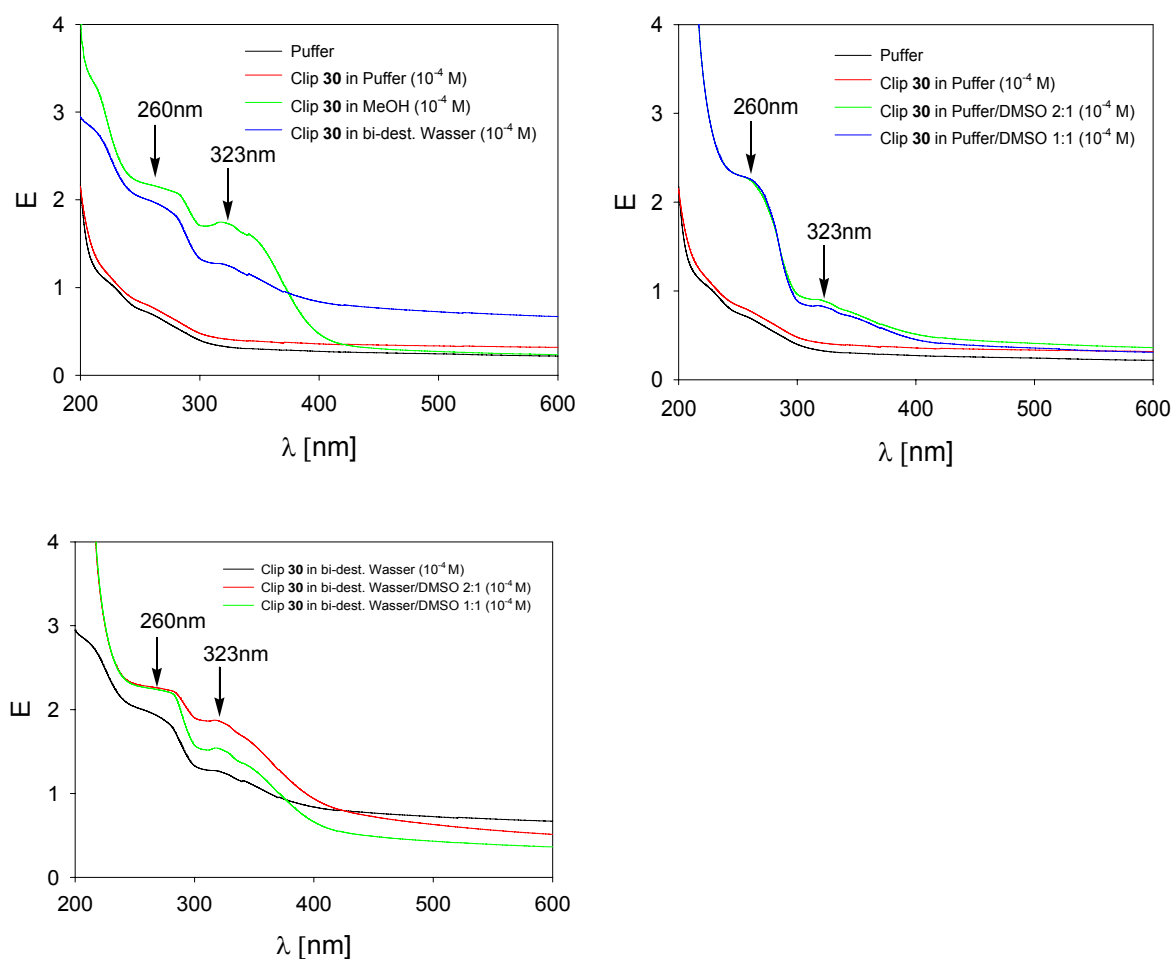


Abbildung 4.118: UV/Vis-Spektren des Clips **30** in Puffer, bi-dist. Wasser und Methanol.

Die ermittelten Bindungskonstanten sind der Tabelle 4.23 zu entnehmen.

	Medium	K_a [M^{-1}]
29 + Ac-Lys-OMe	Bi-dest. Wasser	263000
29 + H-Lys-OH		13000
30 + NAD⁺		34000
29 + Ac-Lys-OMe	Methanol	11000
29 + H-Lys-OH		12000

Tabelle 4.23: Übersicht der mittels Fluoreszenztitration ermittelten Bindungskonstanten für Tweezer **29** und Clip **30**.

Mit Hilfe der 1H -NMR-Spektroskopie konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass beide Gäste in der Kavität ihres jeweiligen Wirtmoleküls komplexiert werden. Für den 1:1 Komplex des Tweezers **29** mit Ac-Lys-OMe ließen sich wieder Hochfeld-Verschiebungen der Gast-Methylenprotonen bis zu -3.0 ppm beobachten. Tieftemperaturmessungen bei 223 K führten auch hier zu einer Signalverschärfung.

4.5.2.6 Synthese der Pyren-Fluoreszenzsonde **4H**

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit beider Dansylmarkierter Rezeptormoleküle, musste nach einer neuen Fluoreszenzsonde gesucht werden, die in der Lage ist, die geringe Löslichkeit der beiden Inhibitoren durch geeignete Substituenten an ihrer Peripherie zu kompensieren. Mit HPTS sollte sich eine derartige wasserlösliche Fluoreszenzsonde synthetisieren lassen. Die drei als Natriumsalz vorliegenden Sulfatgruppen am Pyrengerüst verleihen ihr eine hervorragende Wasserlöslichkeit. Ferner emittiert HPTS (λ_{ex} 460 nm; λ_{em} 510 nm) im Gegensatz zum Dansylchlorid (λ_{ex} 337 nm; λ_{em} 492 nm) im gewünschten Bereich zwischen 400 und 600 nm. Die Synthese des HPTS-Linkers **4H** erfolgte nach Patentvorschrift US 5132432 in zwei Reaktionsschritten.^[202] Der erste in Abbildung 4.119 dargestellte Reaktionsschritt beinhaltet eine Williamson-Ethersynthese zwischen HPTS (**1H**) und Bromethylacetat (**2H**) in Gegenwart der Hünig's Base Diisopropylethylamin (DIPEA) unter Bildung des Methylesters **3H**. Ausgehend vom Bromethylacetat hätte sich eigentlich der entsprechende Ethylester bilden sollen. Dass hier allerdings der Methylester entsteht, ist auf

eine Umesterung des Ethylesters durch die Anwesenheit des Lösungsmittels Methanol zurückzuführen. Dies konnte mit Hilfe der ^1H -NMR- und MS-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen werden.

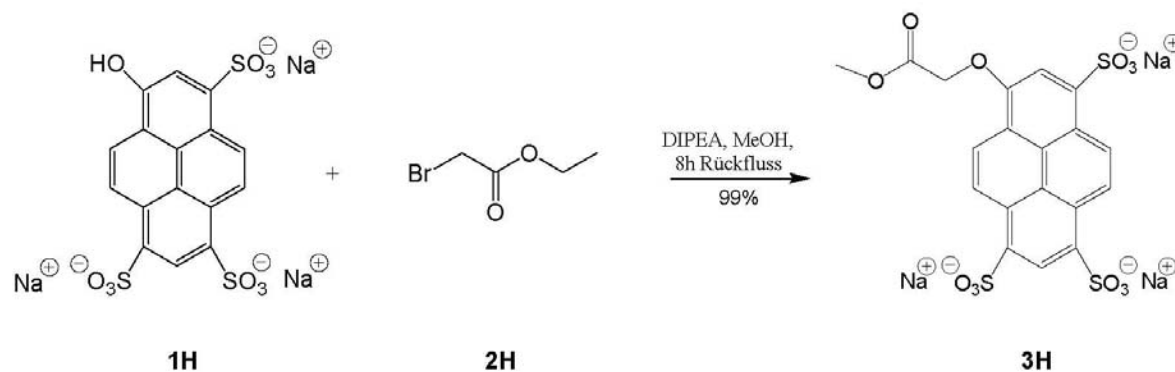


Abbildung 4.119: Synthese des Methylesters **3H**.

Im zweiten Reaktionsschritt, der in Abbildung 4.120 dargestellt ist, erfolgte die basenkatalysierte Hydrolyse des HPTS-Methylesters **3H** unter Bildung der freien Säure **4H**.

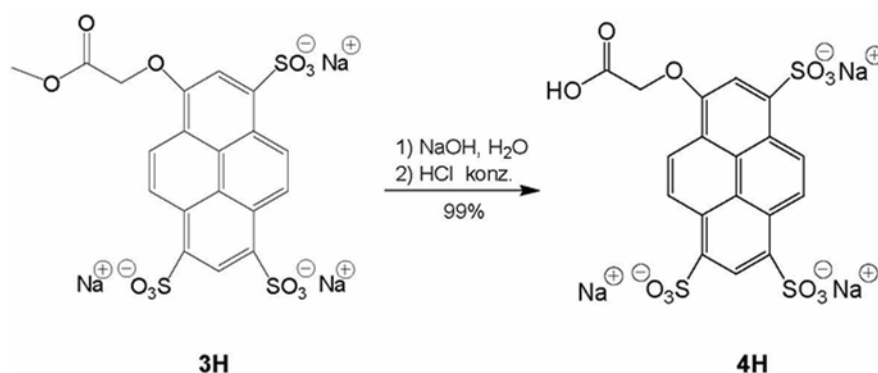


Abbildung 4.120: Synthese der freien Säure **4H**.

4.5.2.7 Syntheserversuche zur Einführung der Sonde **4H** in den Tweezer **750**

Nachdem die freie Säure **4H** erfolgreich synthetisiert werden konnte, wurde zunächst der Versuch unternommen, diese direkt mit dem Bis-Hydroxy-Tweezer **29S** nach der oft bewährten Vorschrift zu verestern (Abbildung 4.121). Allerdings scheiterte dieser Versuch am unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten beider Komponenten.

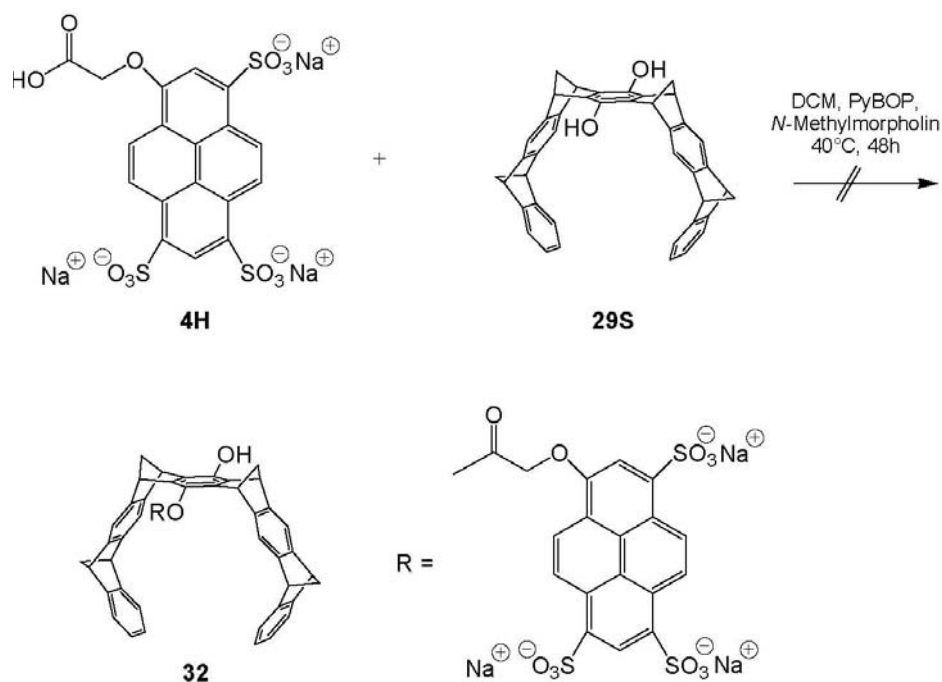


Abbildung 4.121: Syntheseversuch der Kupplung der freien Säure **4H** mit dem entschützten Tweezer **15**.

Als nächstes wurde versucht, die freie Säure **4H** mit dem zuvor synthetisierten entschützten Tweezer **15** über eine Amidfunktion zu koppeln. Die Kupplungsreaktion, die in Abbildung 4.122 dargestellt ist, wurde aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit von **4H** in Gegenwart von *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) und dem Kupplungsreagenz EDC in Wasser durchgeführt. Allerdings konnte aufgrund der Wasserunlöslichkeit des Tweezers **15** keine Umsetzung zum gewünschten Amid beobachtet werden.

In einem weiteren Versuch, der ebenfalls in Abbildung 4.122 dargestellt ist, wurde die Kupplung der wasserlöslichen Fluoreszenzsonde **4H** mit dem entschützten Tweezer **15** in Gegenwart des Phasen-Transfer-Katalysators 15-Krone-5 durchgeführt. Dieser sollte die Natrium-Ionen der Pyrensonde komplexieren und damit ihr den Übergang in die organische Phase ermöglichen. In Gegenwart des NHS-Esters und dem Kupplungsreagenz sollte dann schließlich die Kupplung mit dem Tweezer stattfinden. Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurde das Lösungsmittel abkondensiert. Anschließend wurde der Rückstand in wenig Dichlormethan aufgeschlämmt, im US-Bad behandelt und abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, um die Kupplungsreagenzien vollständig zu entfernen. Allerdings fand auch nach diesem Syntheseweg nicht die gewünschte Umsetzung zum Amid **31** statt.

Der letzte Kupplungsversuch zwischen der Fluoreszenzsonde **4H** und dem entschützten Tweezer **15** erfolgte unter anderen Reaktionsbedingungen (Abbildung 4.122). Statt EDC und NHS-Ester wurden in diesem Fall Cl-HOBT, HCTU und Lutidin eingesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu dem vorherigen Phasen-Transfer-Katalyse-Versuch. Allerdings konnte auch hier keine Umsetzung beobachtet werden.

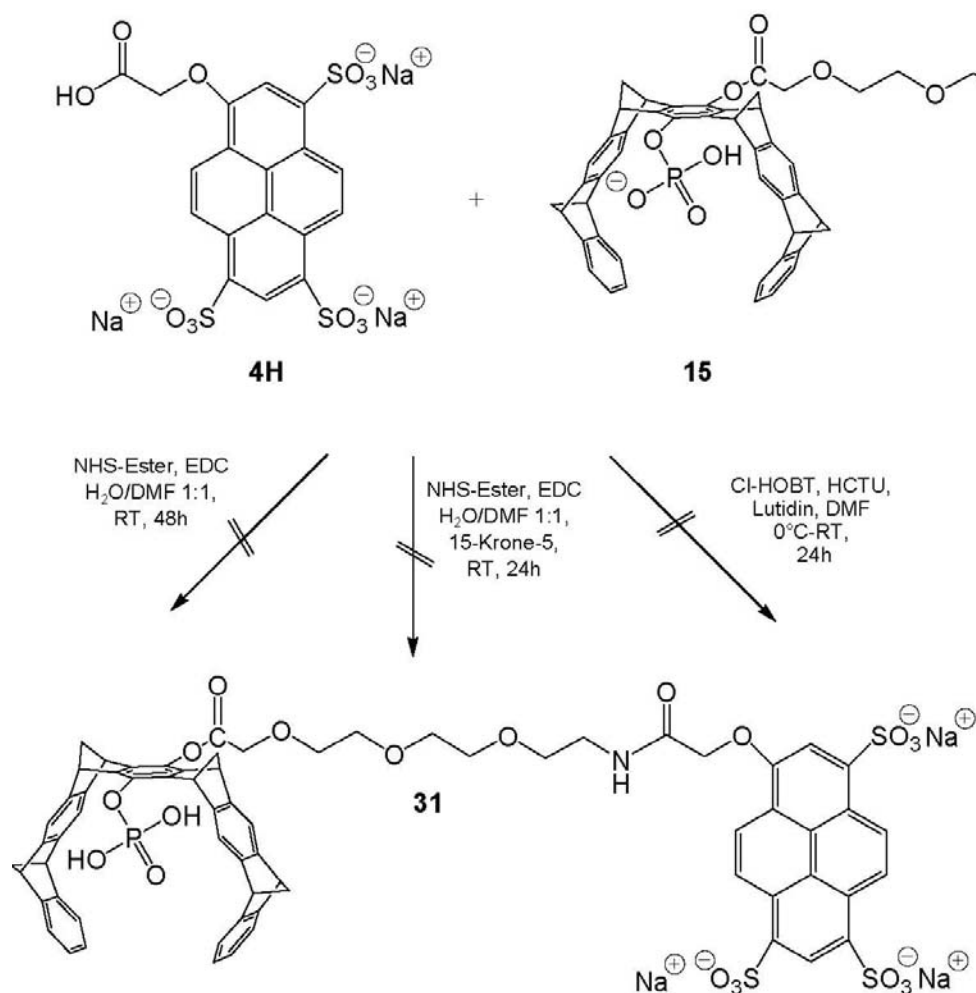


Abbildung 4.122: Drei Kupplungsversuche der freien Säure **4H** mit dem entschützten Tweezer **15**.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Neue Mechanismen der Enzymhemmung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals erfolgreich nachgewiesen werden, dass sich mit den synthetischen wasserlöslichen Rezeptormolekülen Clip **606** und **622** sowie den Tweezern **734** und **750**, enzymatische Reaktionen unter physiologischen Bedingungen beeinflussen lassen. Bezüglich der NAD(P)^+ -abhängigen Enzyme, den Oxidoreduktasen Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) sowie gegenüber der Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP-1) zeigten die molekularen Clips und die molekularen Tweezer, einen für sie jeweils charakteristischen neuen Hemm-Mechanismus.^[108] Während die molekularen Clips gewöhnlich durch Cofaktorabfang inhibieren, geschieht dies bei den molekularen Tweezern durch Komplexierung der auf der Proteinoberfläche befindlichen kritischen basischen Aminosäurenreste. Im Gegensatz zu den meisten künstlichen Inhibitoren fungieren diese Rezeptormoleküle allerdings nicht als Substrat-Mimetika. Nicht die strukturell optimale Anpassung der Rezeptormoleküle an die „Active Site“, sondern die supramolekulare Ausbildung eines entsprechenden Wirt-Gast-Komplexes induziert hier die Enzyminhibition. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes der Universität Duisburg-Essen mit dem Universitätsklinikum Essen wurde von M. Kirsch für den Clip **622** ein weiterer für die G6PD spezifischer neuer Hemm-Mechanismus aufgeklärt.^[137]

5.1.1 Alkohol-Dehydrogenase (ADH)

In diesem Zusammenhang wurde die NAD^+ -abhängige Oxidoreduktase Alkohol-Dehydrogenase (ADH) untersucht. Hierbei gelang erstmals der Nachweis, dass sich in Anwesenheit der oben genannten Rezeptormoleküle die enzymatische Oxidation von Ethanol durch ADH *in vitro* inhibieren lässt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Substrat-Spezifitäten komplexieren die molekularen Clips insbesondere elektronenarme aromatische Gäste wie z. B. NAD(P)^+ während die molekularen Tweezer elektronenarme aliphatische Gäste wie z. B. die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin bevorzugen. Wie man der Abbildung 5.1 entnehmen kann, beruht die inhibitorische Effizienz von Clip **606** und **622** darauf, den Cofaktor NAD^+ aus der „Rossmann-Spalte“ herausziehen und dadurch das zur enzymatischen

Umsetzung essentielle NAD^+ -Niveau so stark zu dezimieren, bis schließlich keine enzymatische Substratoxidation durch die ADH mehr möglich ist.

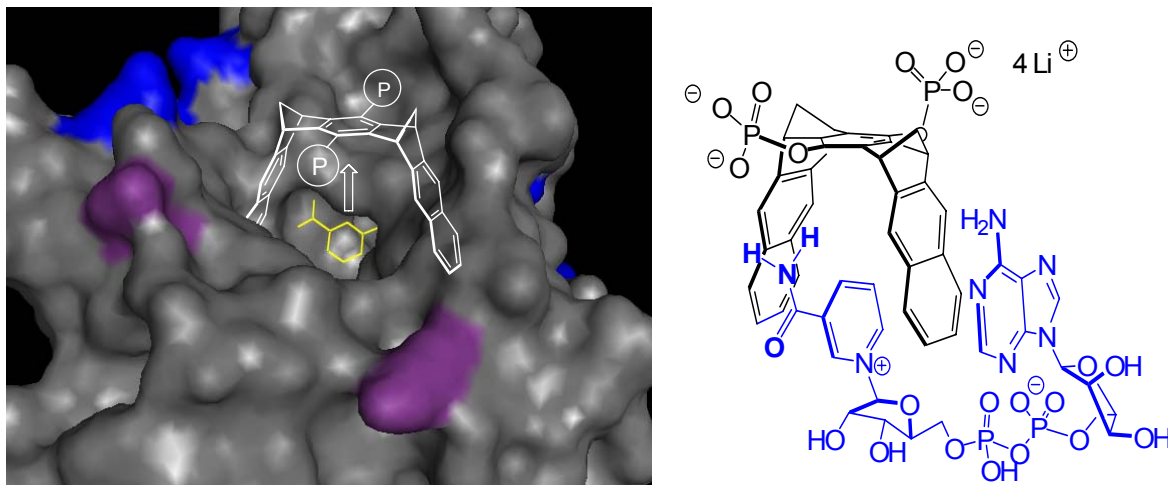


Abbildung 5.1: Links: Vereinfachte Darstellung des postulierten Hemm-Mechanismus für die beiden Clips **606** und **622**. Rechts: Lewis-Struktur des Clips **622** mit komplexiertem Cofaktor NAD^+ basierend auf Molekülrechnungen (MacroModel 8.1, 5000 Schritte, Wasser, Amber).

Lineweaver-Burk-Plots bestätigten diesen kompetitiven Hemm-Mechanismus für beide Clips. Des Weiteren konnte für Clip **622** mit Hilfe der CD-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen werden, dass dieser zusätzlich zur NAD^+ -Komplexierung unspezifisch an das Enzym bindet und dadurch eine irreversible Denaturierung der ADH hervorruft.

Im Gegensatz zu den beiden Clips **606** und **622** komplexieren die beiden Tweezers **734** und **750** den Cofaktor NAD^+ vernachlässigbar gering. Trotzdem erwiesen sich beide Tweezers als wesentlich effektivere ADH-Inhibitoren. Wie man der Tabelle 5.1 entnehmen kann, liegen ihre IC_{50} -Werte im Vergleich zu den Clips eine Größenordnung niedriger. Dass hier ein anderer Hemm-Mechanismus vorliegt als im Fall der Clips, zeigen die entsprechenden Lineweaver-Burk-Plots. Demnach verhalten sich beide Tweezers sowohl gegenüber Cofaktor als auch gegenüber Substrat nichtkompetitiv. Es liegt nahe, dass die Tweezer aufgrund ihrer hohen Affinität gegenüber Lysinen die auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenreste komplexieren, insbesondere die, die sich im Bereich der Enzym-Bindungsstelle befinden. Hierdurch blockieren die Tweezer dem Cofaktor den Zugang zur „Active Site“. Abbildung 5.2 zeigt eine vereinfachte Darstellung dieses postulierten Hemm-Mechanismus.

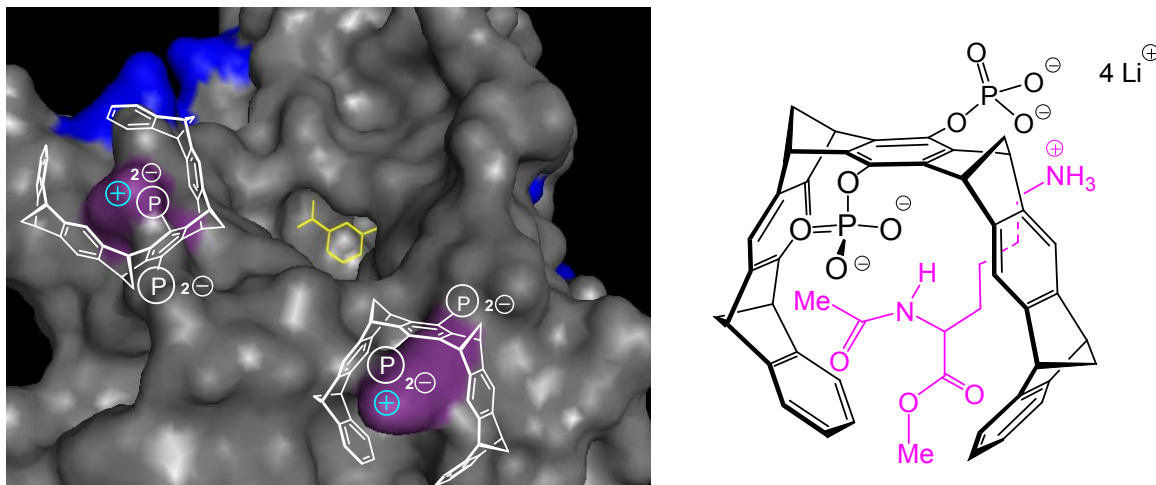


Abbildung 5.2: Links: Vereinfachte Darstellung des postulierten Hemm-Mechanismus für die beiden Tweezers **734** und **750**. Rechts: Lewis-Struktur des Tweezer **750** mit komplexiertem Lysin-Derivat Ac-Lys-OMe basierend auf Molekülrechnungen (MacroModel 8.1, 5000 Schritte, Wasser, Amber).

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie gelang es in Anwesenheit des Tweezers **750** eine reversible Konformationsänderung der ADH nachzuweisen. So lässt sich für Tweezer **750** im Gegensatz zum Clip **622** nach vorausgegangener vollständiger Inhibition durch Zugabe eines geeigneten Konkurrenz-moleküls das ursprüngliche CD-Spektrum der nativen ADH wieder zurückgewinnen. Diese reversible Hemmung konnte auch durch Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente bestätigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass das Ausmaß der Rückgewinnung der ursprünglichen enzymatischen Aktivität mit der Affinität der dafür geeigneten Aminosäuren gegenüber dem Tweezer korreliert.

Um zu beweisen, dass alle vier Rezeptormoleküle ihre inhibitorischen Fähigkeiten allein der Existenz ihrer Seitenwände und der daraus resultierenden Kavität verdanken und nicht auf elektrostatische Wechselwirkungen der Phosphonat- bzw. Phosphat-Substituenten mit den auf der Proteinoberfläche befindlichen basischen Aminosäurenresten zurückzuführen sind, wurde die enzymkinetische Untersuchung in Anwesenheit der Modellverbindung Spacer **422** durchgeführt. Diese Modellverbindung, die im Gegensatz zu den vier Rezeptormolekülen über keine Seitenwände verfügt, zeigte keine inhibitorische Wirkung. Eine weitere Bestätigung resultierte aus enzymkinetischen Untersuchungen, die in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen durchgeführt wurden: Auch bei Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen blieb die inhibitorische Wirkung der Rezeptormoleküle erhalten.

5.1.2 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD)

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen den Arbeitsgruppen T. Schrader und F.-G. Klärner von der Universität Duisburg-Essen und M. Kirsch und H. de Groot vom Universitätsklinikum Essen wurde die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) als ein aus therapeutischer Sicht besonders attraktives Zielprotein indentifiziert. Dieses fungiert als „Schrittmacherenzym“ des Pentosephosphatweges, und spielt eine entscheidende Rolle beim Zellwachstum. Eine effektive Hemmung der G6PD sollte zur Herabsetzung der Proliferationsrate vieler Zelltypen führen und so für die Bekämpfung von Krebszellen interessant sein. Alle erforderlichen enzymkinetischen Untersuchungen wurden von M. Kirsch am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Im Unterschied zur ADH wurden in diesem Projekt zunächst nur die beiden Clips **606** und **622** bezüglich ihrer inhibitorischen Potentiale untersucht. Da G6PD ebenso wie die Alkohol-Dehydrogenase zur Familie der Oxidoreduktasen zählt, spielt auch hier der Cofaktor die entscheidende Rolle. Im Gegensatz zur ADH ist dies aber nicht NAD^+ , sondern NADP^+ . Da beide Cofaktoren ähnlich stark komplexiert werden, wäre zu erwarten gewesen, dass die Clips **606** und **622** analog zur ADH dem klassischen Cofaktor-Abfang-Hemm-Mechanismus folgen. Dieser kompetitive Hemm-Mechanismus konnte für Clip **606** eindeutig nachgewiesen werden. Für Clip **622** ergab sich dagegen überraschenderweise ein weit im substöchiometrischen Bereich liegender IC_{50} -Wert. Diese außergewöhnlich hohe inhibitorische Effizienz des Clips **622** gegenüber Clip **606** kann nicht mehr allein auf die mäßig effektive Komplexierung des Cofaktors zurückgeführt werden. Dagegen spricht auch der ungewöhnliche Schnittpunkt im ersten x,y-Quadranten, der sich bei der Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots bei variabler Cofaktor-Konzentration ergab. Anhand eines Literaturbeispiels konnte dieser dem so genannten partiell unkompetitiven Hemm-Mechanismus zugeordnet werden.^[89, 140] Dass es sich hierbei wirklich um eine partielle und nicht vollständige Inhibition handelt, konnte durch die zweite Auftragung nach Whiteley eindeutig bewiesen werden. Allerdings unterscheidet sich dieser Schnittpunkt deutlich von den klassischen Lehrbuchbeispielen. Im Gegensatz zu den bereits bekannten partiellen Hemm-Mechanismen befindet sich der Schnittpunkt nicht im negativen, sondern im positiven Abzissen-Bereich. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Gerade mit der Substratkonzentration im Gegensatz zur klassischen partiell unkompetitiven Hemmung ansteigt. Die Lage des Schnittpunkts und der Geradenanstieg sind ein in der Literatur bislang unbekannter Befund. Basierend auf diesen experimentellen Erkenntnissen wird für Clip **622** ein ternärer Komplex angenommen. Danach bindet Clip **622** an den Enzym-

Cofaktor-Komplex ohne die Fähigkeit, den Cofaktor in seiner Kavität zu komplexieren, einzubüßen. Gleichzeitig ermöglicht dieser ternäre Komplex die verlangsamte, partielle, enzymatische Umsetzung des Substrats G6P.

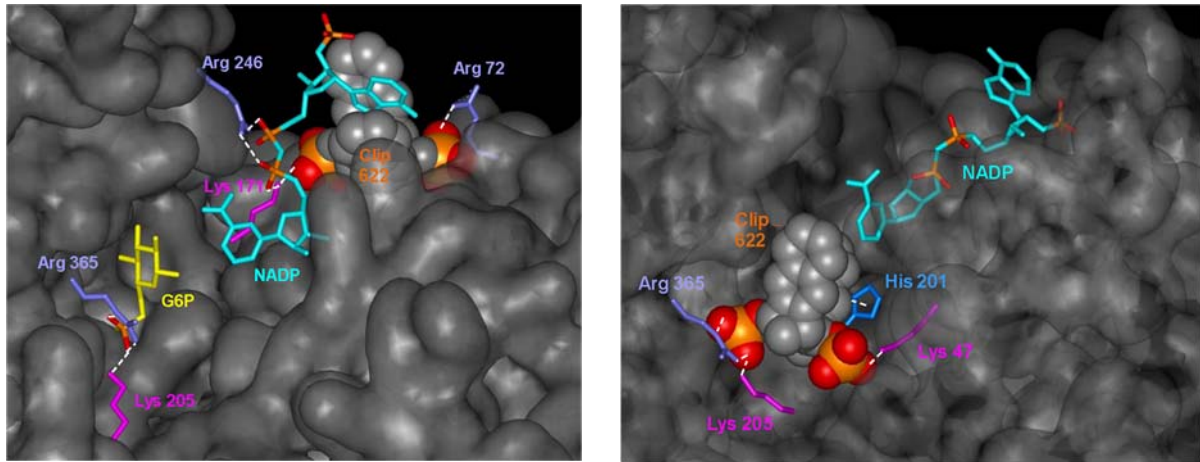


Abbildung 5.3: : MD-Simulation des ternären (links) und Kraftfeld-Berechnung des binären Komplexes (rechts) ausgehend von der „universellen“ Kristallstruktur der menschlichen G6PD, die sich aus einer Kombination der beiden PDB-Kristallstrukturen 2BHL und 2BH9 ergab.

Allerdings lässt sich die in einem Inhibitions-und Reaktivierungsexperiment beobachtete vollständige Inhibition der G6PD durch den Clip **622** allein mit Hilfe dieses neuen partiell unkompetitiven Hemm-Mechanismus nicht ganz erklären. Es war daher zu vermuten, dass es noch einen weiteren inhibitorischen Effekt gibt. Der Lineweaver-Burk-Plot zeigte, dass bei variabler Substratkonzentration zusätzlich ein gemischter Substrat-Hemm-Mechanismus vorliegt. Danach konkurriert Clip **622** neben seiner Funktion als NADP⁺-Falle nicht nur um die Cofaktor-Bindungsstelle unter Ausbildung eines ternären Komplexes, sondern auch um die Substrat-Bindungsstelle. Clip **622** hat damit insgesamt drei Funktionen. Der neue für G6PD spezifische duale Hemm-Mechanismus durch gleichzeitige Bildung eines binären und ternären Komplexes konnte mittels ITC-Messungen und Molecular Modelling (Abbildung 5.3) eindeutig aufgeklärt werden.

5.1.3 Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP-1)

Nachdem der Nachweis gelungen war, dass die Rezeptormoleküle potente Inhibitoren für die beiden Oxidoreduktasen ADH und G6PD sind, wurde anschließend ihr inhibitorisches Potential auch am Beispiel eines den Dehydrogenasen völlig unähnliches Protein untersucht. Es kam dabei nur ein aus therapeutischer Sicht attraktives Zielprotein wie die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Frage. Im Gegensatz zu den beiden zuvor untersuchten Dehydrogenasen ist die enzymatische Aktivität von PARP-1 auf keinen Cofaktor angewiesen. NAD^+ dient hier lediglich als Substrat. Ihre Attraktivität als Zielprotein verdankt PARP-1 vor allem der Tatsache, dass sie eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur spielt. Je nach Ausmaß der DNA-Schäden kann PARP-1 entweder das Überleben der Zelle fördern, oder den Zelltod induzieren. Bei einer effektiven Inhibition von PARP-1 unterliegt die Zelle dem apoptotischen Zelltod. Dadurch wird die Apoptoseresistenz der Krebszellen unterlaufen. Dies ist insbesondere bei der Krebstherapie von großem Interesse. Äußerst effektive PARP-1-Inhibitoren mit IC_{50} -Werten im einstelligen nanomolaren Bereich finden bereits Verwendung in der Onkologie als effektive Antitumormittel. Den meisten bis heute bekannten PARP-1-Inhibitoren ist allerdings gemein, dass deren inhibitorische Wirksamkeit darin begründet liegt, als Substrat-Mimetika zu agieren. Die verwendeten Inhibitoren Clip **622** und Tweezer **750** weisen keinerlei strukturellen Ähnlichkeiten zum Substrat NAD^+ auf. Die mit diesen Molekülen festgestellte inhibitorische Wirkung beruht daher auf einem neuen für PARP-1 noch unbekannten Hemm-Mechanismus. Wie bei den bereits zuvor untersuchten Dehydrogenasen ADH und G6PD war auch diesmal der Tweezer **750** am effektivsten. Entsprechend den Lineweaver-Burk-Plots folgt Clip **622** wieder einem kompetitiven Hemm-Mechanismus und Tweezer **750** einem nichtkompetitiven Hemm-Mechanismus. Letzterer dürfte wieder aus der Komplexierung der auf der Proteinoberfläche befindlichen kritischen basischen Aminosäurenreste resultieren. Einen ersten Hinweis auf die DNA-bindende Domäne als potentiellen Angriffsort des Tweezers **750** lieferte ein Inhibitions- und Reaktivierungsexperiment. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sich die enzymatische Aktivität nach vorausgegangener vollständiger Inhibition durch Zugabe eines Überschusses an DNA wieder reaktivieren lässt. Eine plausible Erklärung hierfür könnte sein, dass die Lysin- und Arginin-reichen Zinkfinger-Motive F1 und F2 durch die Komplexierung des Tweezers **750** ihre Funktion als DNA-Strangbruch-Sensoren nicht mehr ausüben können und folglich Inhibition induzieren. Dieser störende Einfluss des Tweezers bei der DNA-Erkennung von PARP-1 konnte in einem Fluoreszenzexperiment mit fluoreszenzmarkierter

DNA, die gleichzeitig einen DNA-Einzelstrangbruch simuliert, eindeutig nachgewiesen werden. Für die beiden Zinkfinger-Motive als potentiellen Angriffsort des Tweezers spricht auch die Fluoreszenztitration von Tweezer **750** mit Zinkchlorid. Demnach komplexiert Tweezer **750** im Vergleich zu anderen Übergangsmetall-Ionen bevorzugt Zink-Ionen. Die ermittelte Bindungskonstante K_a beträgt etwa 200000 M^{-1} . Aufgrund dieser hohen Affinität des Tweezers gegenüber Zink-Ionen liegt die Vermutung nahe, dass der Tweezer **750** bevorzugt basische Aminosäurenreste in unmittelbarer Nähe dieser koordinativen Zink-Ionen komplexiert. Durch diese Komplexbildung könnte eine Konformationsänderung innerhalb der beiden Zinkfinger-Motive induziert werden, die zum Funktionsverlust beider Zinkfinger-Motive beitragen könnte. Für einen derartigen Hemm-Mechanismus sprechen auch die mit Hilfe des Molecular Modelling berechneten zahlreichen stabilen Komplexe des Tweezers mit leicht zugänglichen Lysinen beider Zinkfinger-Motive.

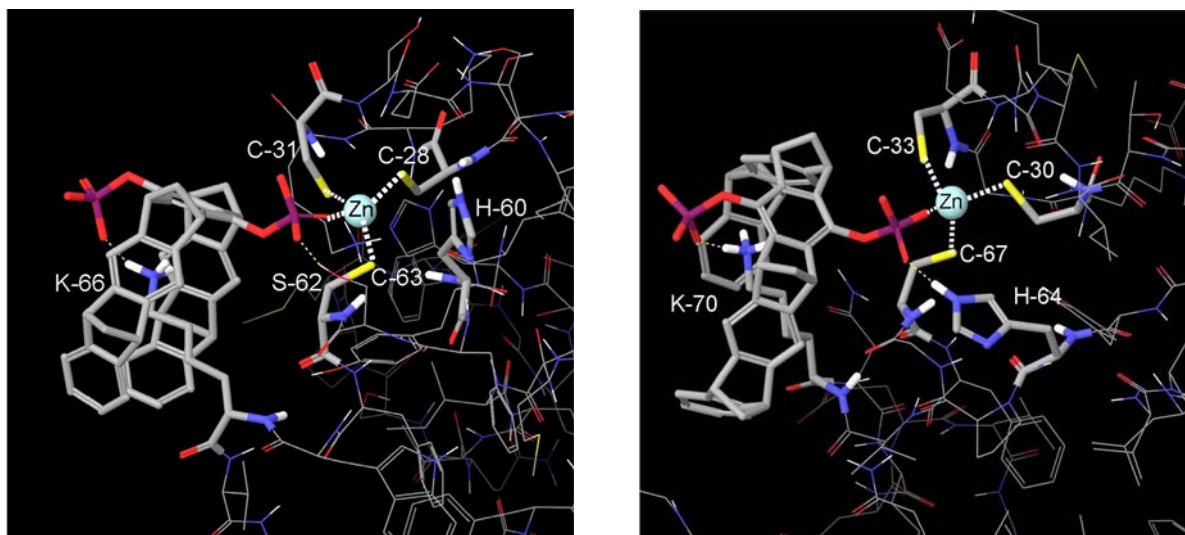


Abbildung 5.4: MD-Simulationen der binären Komplexe Tweezer **750**@ Lys-66 des ersten Zinkfinger-Motivs F1 (links) und Tweezer **750**@ Lys-70 des zweiten Zinkfinger-Motivs F2 (rechts).

Dabei konnte für jedes Zinkfinger-Motiv eine Komplexstruktur berechnet werden, die neben der Komplexbildung eines Lysins gleichzeitig die Ausbildung einer koordinativen Bindung von einem der beiden Phosphat-Substituenten des Tweezers zum koordinativen Zink-Ion ermöglicht. Beide ermittelten Strukturen blieben bei einer MD-Simulation über einen Zeitraum von 5 ns stabil (Abbildung 5.4).

In den folgenden Tabellen 5.1, 5.2 und 5.3 sind die IC_{50} -Werte sowie die Hemm-Mechanismen der untersuchten Proteine zusammengefasst.

Übersicht der IC_{50} -Werte sowie der Hemm-Mechanismen aller hier untersuchten Enzyme

Protein	Alkohol-Dehydrogenase (ADH)			
Inhibitor	Clip 606	Clip 622	Tweezer 734	Tweezer 750
IC_{50} [μM]	2300 (1.3 eq bzgl. NAD^+)	1470 (0.8 eq bzgl. NAD^+)	363 (0.2 eq bzgl. NAD^+)	178 (0.1 eq bzgl. NAD^+)
Hemm-Mechanismus	kompetitiv vs NAD^+ nichtkompetitiv vs EtOH		nichtkompetitiv vs NAD^+ gemischt vs EtOH	

Tabelle 5.1: IC_{50} -Werte und Hemm-Mechanismen der ADH.

Protein	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD)	
Inhibitor	Clip 606	Clip 622
IC_{50} [μM]	350 (1.8 eq bzgl. $NADP^+$)	7 (0.03 eq bzgl. $NADP^+$)
Hemm-Mechanismus	kompetitiv vs $NADP^+$ nichtkompetitiv vs G6P	partiell unkompetitiv vs $NADP^+$ gemischt vs G6P

Tabelle 5.2: IC_{50} -Werte und Hemm-Mechanismen der G6PD.

Protein	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP-1)	
Inhibitor	Clip 622	Tweezer 750
IC_{50} [μM]	63	3.8
Hemm-Mechanismus	kompetitiv vs NAD^+	nichtkompetitiv vs NAD^+

Tabelle 5.3: IC_{50} -Werte und Hemm-Mechanismen von PARP-1.

5.2 Synthese polymerisationsfähiger und fluoreszenzmarkierter Rezeptormoleküle

Neben der Resynthese der für die enzymatischen Untersuchungen verwendeten wasserlöslichen Rezeptormoleküle **606**, **622**, **734** und **750** sowie des Spacers **422** als Modellverbindung umfasste der synthetische Teil dieser Arbeit die Modifizierung der beiden Phosphat-substituierten Rezeptormoleküle Tweezer **750** und Clip **622**. Ziel war die Optimierung ihrer inhibitorischen Effizienz und die Entwicklung von Fluoreszenzsonden. Die Idee des ersten Synthese-Prinzips bestand darin, dass ein polymerisierter Tweezer in der Lage sein müsste, mehrere benachbarte kritische Lysine auf einmal zu komplexieren. Dies würde dessen inhibitorische Effizienz erhöhen und folglich einen niedrigeren IC_{50} -Wert hervorrufen. Um die inhibitorische Effizienz beider Rezeptormoleküle zu erhöhen, sollte jeweils einer der beiden Phosphat-Substituenten gegen eine polymerisierfähige Methacrylamid-Gruppe ausgetauscht werden. Beide Rezeptormoleküle, deren Strukturen in Abbildung 5.5 dargestellt sind, konnten erfolgreich synthetisiert werden.

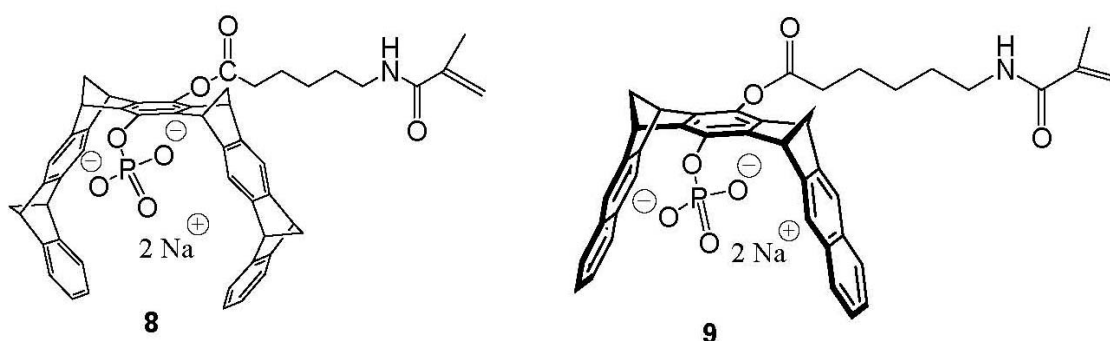


Abbildung 5.5: Übersicht der beiden polymerisierfähigen Rezeptormoleküle Tweezer **8** und Clip **9**.

Der Verlust einer der beiden Phosphat-Substituenten an der zentralen Benzol-„Spacereinheit“ führte allerdings zu einer deutlichen Löslichkeitsverminderung beider Monomere. Ihre Komplexeigenschaften blieben dagegen unbeeinflusst. Zahlreiche Versuche, die beiden neuen Rezeptormoleküle zu polymerisieren, blieben erfolglos. Das Scheitern der radikalischen Polymerisation könnte auf sterische Effekte, die mit der Größe der Monomere **8** und **9** zusammenhängen oder auch durch Spuren von Radikalfängern verursacht worden sein.

Mit der Synthese fluoreszenzmarkierter Tweezer bzw. Clips sollte der Weg für Zellkultur-Experimente geöffnet werden, um die unterschiedlichen inhibitorischen Wirkungsweisen

beider Rezeptorklassen in der Zelle verfolgen und letztendlich aufklären zu können. Dies ist insbesondere für das Alzheimer-Kooperationsprojekt mit G. Bitan von der David Geffen School of Medicine in Los Angeles von essentieller Bedeutung. G. Bitan konnte nachweisen, dass sich in Gegenwart des Tweezers **750** die für die Alzheimersche Krankheit verantwortliche $A\beta(1-42)$ -Aggregation hemmen lässt. Es wird angenommen, dass der Tweezer **750** das Lysin K-28 komplexiert und dadurch die Ausbildung der wahrscheinlich für die Aggregation verantwortlichen Salzbrücke zwischen dem Lysin K-28 und dem Aspartat D-23 innerhalb des Amyloids $A\beta(1-42)$, die in der Abbildung 5.6 dargestellt ist, verhindert. Mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Tweezers **750** wäre es möglich nachzuweisen, wo der Tweezer in der Zelle seine inhibitorische Wirkung entfaltet. Ferner könnte eindeutig die Frage geklärt werden, ob der Tweezer **750** bzw. der Clip **622** in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Diese Information wäre für künftige Tierexperimente von enormer Wichtigkeit.

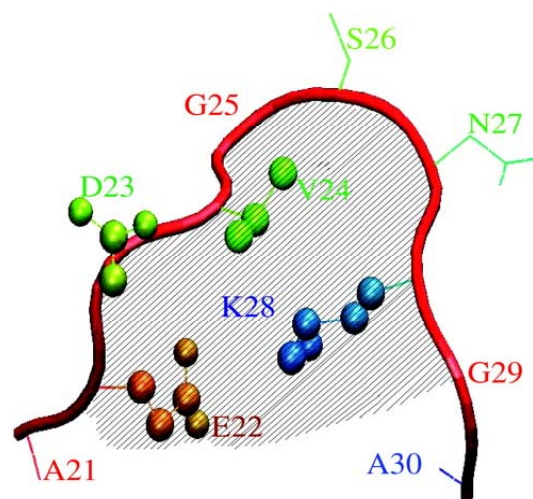


Abbildung 5.6: Modell des „β-Turns“ des Amyloids $A\beta(1-42)$. Jedes $A\beta$ -Molekül besteht aus zwei β-Strängen, die über einen „β-Turn“ miteinander verknüpft sind. Dieser „β-Turn“ wird vor allem durch die Salzbrücke zwischen Lys-28 und Asp-23 stabilisiert.

Die Einführung einer Fluoreszenzsonde an die zentrale Benzol-„Spacereinheit“ des entsprechenden Rezeptors über einen Triethylenglykol-Linker (TEG-Linker) hat sich als recht schwierig erwiesen. So scheiterte die Einführung der Fluoreszenzsonde im letzten Reaktionsschritt. Diese Methode hätte den Vorteil gehabt, dass sie für empfindliche Fluoreszenzsonden besonders schonend gewesen wäre. Ferner hätte die Möglichkeit bestanden innerhalb kürzester Zeit unterschiedliche Fluoreszenzsonden an das fertige

Grundgerüst der Sonde zu kuppeln. Der zweite Syntheseweg sah dagegen zunächst die Synthese des Dansylmarkierten TEG-Linkers **24** vor. Diese Syntheseroute hatte jedoch den Nachteil, dass die Auswahl der Fluoreszenzsonden stark limitiert war. Nur solche Fluoreszenzsonden waren für die Einführung in die Rezeptormoleküle geeignet, die über keine zusätzlichen funktionellen Gruppen verfügten, da diese in den einzelnen Syntheseschritten, wie z. B. bei der Phosphorylierung zu unerwünschten Nebenprodukten geführt hätten. Damit schieden Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Fluorescamin als potentielle Sonden aus. Die in Abbildung 5.7 dargestellten Dansylmarkierten Tweezer **29** und Clip **30** ließen sich dagegen nach dieser Syntheseroute problemlos herstellen. Allerdings trat auch hier, wie zuvor im Fall der polymerisierfähigen Rezeptormoleküle **8** und **9** ein vermindertes Löslichkeitsverhalten auf. Dieses konnte wiederum auf den Verlust einer der beiden Phosphat-Substituenten zurückgeführt werden. Die Komplexeigenschaften beider Rezeptormoleküle **29** und **30** blieben dagegen erhalten.

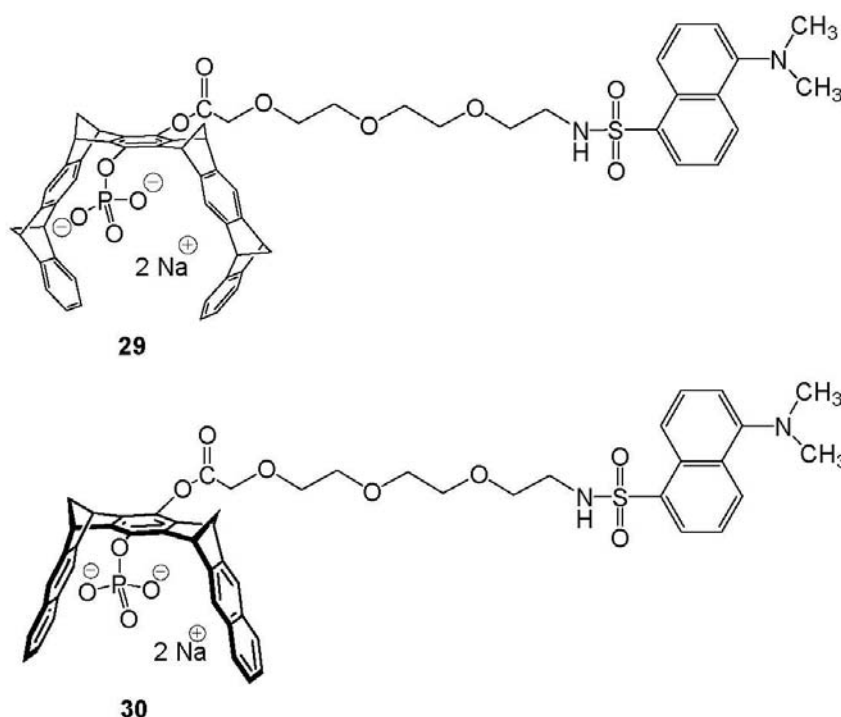


Abbildung 5.7: Übersicht der beiden polymerisierfähigen Rezeptormoleküle Tweezer **29** und Clip **30**.

5.3 Ausblick

Am Beispiel der untersuchten NAD(P)^+ -abhängigen Enzyme, den Dehydrogenasen ADH und G6PD, sowie der Polymerase PARP-1 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Gastspezifität der vier bereits bekannten wasserlöslichen Rezeptormolekül unter physiologischen Bedingungen und in der biologischen Umgebung der Protein-Bindungstasche erhalten bleibt. Dabei erwiesen sich insbesondere die beiden nicht-toxischen Phosphat-substituierten Inhibitoren Clip **622** und Tweezer **750** als besonders effektiv. Die Nicht-Toxizität ist eine grundlegende Eigenschaft die potente Inhibitoren haben müssen, um in Zellkultur- und Tierexperimenten eingesetzt werden zu können. Der Tweezer **750**, der in der Lage ist, alle auf der Proteinoberfläche leicht zugänglichen basischen Aminosäurenreste zu komplexieren, ist ein potenter Inhibitor für nahezu alle Lysin-und Arginin-reichen Proteine. Es sollte daher diesbezüglich über ein „Screening“ verschiedener aus therapeutischer Sicht attraktiver Zielproteine, wie z. B. den Sirtuinen oder Farnesyltransferasen nachgedacht werden.^[203, 204] Zudem könnten die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur starken Komplexierung von Zink-Ionen durch den Tweezer **750** verwendet werden, um den Tweezer so zu modifizieren, dass dieser spezifisch Zinkfinger-Motive von Proteinen erkennen kann. So wäre es denkbar, einen der beiden Phosphat-Substituenten z. B. durch eine Cyclolactam-Gruppe zu ersetzen, die in der Lage wäre gezielt das koordinative Zink-Ion des Proteins anzusteuern und selektiv zu binden. Gleichzeitig könnte der modifizierte Tweezer über den noch freien Phosphat-Substituenten eine in direkter Nähe des koordinativen Zink-Ions befindliche kritische basische Aminosäure in seiner Kavität komplexieren. Die Einführung solcher strukturerkennender Substituenten an die zentrale Benzol-„Spacereinheit“ des Tweezers könnte zu einer höheren Selektivität und folglich zu einer höheren inhibitorischen Effizienz führen. Um den Verlust des zweiten Phosphat-Substituenten bei der Einführung einer solchen strukturerkennenden Gruppe zu kompensieren, könnte z. B. der noch verbleibende Phosphat-Substituent in eine Pyrophosphatgruppe überführt werden. Auf diese Weise blieben die vier negativen Ladungen erhalten und die Löslichkeitsprobleme, wie sie bereits zuvor bei den polymerisierfähigen und fluoreszenzmarkierten Rezeptormolekülen zu beobachten waren, würden dadurch behoben. Auch der Versuch, die beiden Rezeptormoleküle mit einer Fluoreszenzsonde auszustatten, sollte fortgesetzt werden. Allerdings sollte bei der Wahl der Fluoreszenzsonde und des Linkers darauf geachtet werden, dass diese unter anderem über unpolare Estergruppen verfügen. Diese sollten die Permeabilität des fluoreszenzmarkierten Tweezers durch die Zellmembran ermöglichen.

Innerhalb der Zelle würden die Estergruppen dann von den entsprechenden Esterasen gespalten werden und so zu einer höheren Löslichkeit des modifizierten Tweezers beitragen. Eine Alternative zur Fluoreszenzmarkierung stellt die radioaktive Markierung dar. So könnte z. B. ^{14}C -markiertes Diazomethan mit dem Phosphat-Tweezer zur Umsetzung gebracht werden. Dabei würde ein Teil des Phosphat-Tweezers in ^{14}C -markierten Phosphonat-Tweezer umgewandelt werden. Der Vorteil eines ^{14}C -markierten Tweezers gegenüber einem ^{32}P -markierten Tweezer besteht vor allem in seiner längeren Halbwertszeit. Während die Halbwertszeit des ^{32}P -Isotops nur etwa 14 Tage beträgt, liegt die des ^{14}C -Isotops bei etwa 5730 Jahren.^[205-207] Durch die Pyrophosphorylierung der noch verbleibenden Phosphatgruppe könnten wiederum die Löslichkeit verbessert werden.

Basierend auf den neuen Erkenntnissen dieser Arbeit bezüglich der Enzymhemmung durch Clip- und Tweezer-Moleküle könnten durch weitere Molekülmodifikationen noch mehr neue wichtige Anwendungen dieser Inhibitorklassen für therapeutische Zwecke erschlossen werden. Heute wird z. B. Clip **622** bereits als Pyridinium-Wirt zur Behandlung, Diagnose und Vorbeugung altersbedingter Makula-Degeneration (AMD) eingesetzt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass das in der Retina produzierte lipophile Kation *N*-Retinyl-*N*-retinyliden-ethanolamin (A2E) stark in der elektronenreichen Clip-Kavität komplexiert wird. Diese Komplexierung des Terpen-substituierten *N*-Alkylpyridiniumderivats A2E durch den Clip **622** verhindert die Bildung des kritischen Komplexes zwischen A2E und Cytochrom-c-Oxidase und folglich den damit verbundenen apoptotischen Zelltod. Zellkultur-Experimente mit Retinal Epithelium Zellen ergaben für die Apoptose-Verhinderung IC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich.^[88, 208]

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine experimentelle Methoden

Lösungsmittel

Je nach Bedarf wurden die verwendeten Lösungsmittel vor Gebrauch destilliert bzw. nach den in der Literatur beschriebenen Methoden getrocknet.^[209]

Chromatographie

Die Durchführung der analytischen Dünnschichtchromatographie (DC) zur Verfolgung des Reaktionsverlaufs erfolgte mit DC-Platten Polygram SIL G/UV254 der Firma Macherey-Nagel. Die präparative Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel 60 (Korngröße 70-200 µm) als stationäres Füllmaterial einer Fallsäule durchgeführt.

Schmelzpunkte

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit dem Gerät 9100 der Firma Electrothermal. Diese wurden unkorrigiert angegeben.

IR-Spektren

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte an dem Varian 3100 FT-IR-Spektrometer. Die Messungen wurden entweder als Durchstrahlspektrum mit einem KBr-Pressling oder in diffuser Reflexion auf einem Diamanten durchgeführt.

UV/Vis-Spektren

Die UV/Vis-Spektren wurden mit dem Jasco V-550-Spektrometer aufgenommen. Die entsprechenden Lösungen wurden in einer Quarzküvette der Schichtdicke 1 cm vermessen.

Fluoreszenzspektren

Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte an dem Jasco FP-6500-Spektrofluorometer. Die jeweiligen Lösungen wurden in einer Quarz-Rundküvette der Schichtdicke 1 cm vermessen.

Massenspektren

Alle Massenspektren wurden von Herrn Dipl.-Ing. Karow und Herrn Dipl.-Ing. van Hoof an dem Bruker BioTOF II- Massenspektrometer mit Elektronensprayionisation aufgenommen.

NMR-Spektren

Die NMR-Messungen wurden sowohl am Bruker DMX 300 als auch am Bruker DRX 500 durchgeführt. Alle NMR-Experimente, die zur Aufklärung neuer Verbindungen dienten, d. h., eindimensionale (^1H ; ^{13}C ; DEPT 90; DEPT 135; ^{31}P) sowie zweidimensionale (^1H , ^1H -COSY; ^1H , ^{13}C -COSY; HMBC; HMQC; NOESY) Messungen, wurden ausschließlich am Bruker DRX 500 von Herrn Dipl.-Ing. Bandmann und Herrn Dr. Schaller durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen wurden in δ -Werten relativ zu Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) angegeben. Als Referenzsignal diente der undeuterte Anteil des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels. Bei den ^1H -NMR-Spektren, die in D_2O bzw. in dem auf D_2O basierenden Phosphatpuffer aufgenommen wurden, erfolgte die Referenzierung auf das synthesebedingt enthaltene Methanol-Signal bei $\delta = 3.34$ ppm. Für die Kennzeichnung der Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: Singulett: s; Dublett: d; Triplett: t; Quartett: q; Multipllett: m; Dublett von Dublett: dd; Dublett von Triplett: dt. Die Stereochemie unterscheidbarer ^1H -Kerne an einem C-Atom wurde durch die beiden Buchstaben i (innen) und a (außen) hervorgehoben.

CD-Spektren

Die CD-Spektren wurden am Bruker CD-Spektrometer im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Haberhauer an der Universität Duisburg-Essen (Standort Essen) durch Frau Schneider und Frau Ziegler durchgeführt. Die jeweiligen Lösungen wurden in einer Quarz-Küvette der Schichtdicke 1 cm vermessen.

Röntgenstrukturanalyse

Die röntgenspektroskopischen Untersuchungen wurden am Diffraktometer SMART der Firma Siemens im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Boese an der Universität Duisburg-Essen (Standort Essen) durch Herrn Dipl.-Ing. Bläser durchgeführt.

Isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC)

Die Durchführung der ITC-Messungen erfolgte am Microcal VP-ITC bei einer Referenzstärke von 10 $\mu\text{cal/s}$. Alle Messungen wurden mit Hilfe von Herrn Kowski und Frau Dr. Polkowska durchgeführt.

Molecular Modeling

Mit Hilfe des Computer-Programms MacroModel 8.0 ließen sich verschiedene Modellstrukturen konstruieren. Die Energieminimierung sowie die Simulation der Moleküldynamik in wässriger Lösung wurden mit Hilfe des Kraftfelds OPLS-2005 berechnet.

PARP-1-Assay nach Putt und Hergenrother

Die Durchführung des PARP-1-Assays nach Putt und Hergenrother erfolgte mit Hilfe von 96-Loch Mikroplatten aus Polypropylen der Firma NUNC[®]. Im Gegensatz zu den 96-Loch-Mikroplatten aus Polyethylen waren diese gegenüber Temperatur von 110 °C resistent.

6.2 Übersicht der verwendeten Puffer

Darstellung des für die ¹H-NMR-Titrationsen verwendeten Phosphatpuffers

100.7 mg (0.74 mmol) KH_2PO_4 und 20.7 mg (0.52 mmol) NaOH wurden in 10 mL D_2O gelöst. Durch sukzessive Zugabe von weiterem KH_2PO_4 konnte der gewünschte pH-Wert von 7.2 eingestellt werden.

Darstellung der für die Fluoreszenztitrationen, ITC-Messungen und CD-spektroskopischen Untersuchungen verwendeten Phosphatpuffers

Es wurden 3.00 g (25 mmol) Na_2HPO_4 , 3.55 g (25 mmol) NaH_2PO_4 , 0.164 g (1.75 mmol) $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0.073 g (0.25 mmol) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in 250 mL H_2O gelöst. Anschließend wurde soviel 10%ige NaOH-Lösung dazu gegeben bis der gewünschte pH-Wert von 7.6 erreicht war.

Darstellung des ADH-Phosphatpuffers

5.98 g (75 mmol) $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und 0.50 g (22 mmol) Glycin wurden in 300 mL bi-dest. H_2O gelöst. Der gewünschte pH-Wert von 9.0 konnte durch Zugabe von 1 M HCl eingestellt werden.

Darstellung des PARP-1-PBS-Puffers

8.00 g (137 mmol) NaCl, 0.20g (2.7 mmol) KCl, 1.44 g (12 mmol) Na_2HPO_4 und 0.24 g (mmol) KH_2PO_4 wurden in 1 L bi-dest. H_2O gelöst und mit 1 mL TritonX-100 (0.1%) versetzt. Der gewünschte pH-Wert betrug 7.4.

Darstellung des - PARP-1-Tris-Puffers

Es wurden 1.82 g (50 mmol) Trizma-Base und 75 mg (2 mmol) MgCl_2 in 300 mL bi-dest. H_2O gelöst. Durch Zugabe von 1 M HCl konnte der gewünschte pH-Wert von 8.0 eingestellt werden.

6.3 Enzymkinetische Untersuchungen

6.3.1 Enzymkinetische Untersuchungen im Rahmen des ADH-Projektes

6.3.1.1 Bestimmung der IC₅₀-Werte

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden in die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte zunächst 178.5 µL Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer (75 mM/22.2 mM, pH = 9.0) vorgelegt. Anschließend wurden 7.5 µL einer 2.2 M Semicarbazid Hydrochlorid-Lösung, 7.5 µL einer 300 mM Glutathion-Lösung und 16.5 µL einer 27.7 mM NAD⁺-Lösung zugefügt. Danach folgten 20 µL einer 208 nM ADH-Lösung sowie 10 µL der entsprechenden Inhibitor-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (277 mM-34.6 µM). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µL einer Ethanol-Lösung (1.18 mg/mL) gestartet. Das Gesamtvolumen betrug damit 250 µL/Well. Sobald die Zugabe der Ethanol-Lösung erfolgte, wurde die ADH-Aktivität am ELISA-Reader über die mOD-Änderung bei 340 nm über einen Zeitraum von 10 Minuten verfolgt.

6.3.1.2 Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots

Zur Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots wurden in die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte zunächst 178.5 µL Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer (75 mM/ 22.2 mM, pH = 9.0) vorgelegt. Anschließend wurden 7.5 µL einer 2.2 M Semicarbazid Hydrochlorid-Lösung und 7.5 µL einer 300 mM Glutathion-Lösung dazu pipettiert. Je nachdem, ob die Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots bei variabler NAD⁺- oder bei variabler Ethanolkonzentration durchgeführt wurde, folgten an dieser Stelle im ersten Fall 16.5 µL einer NAD⁺-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (0.33 - 7.06 mM) und im zweiten Fall 16.5 µL einer NAD⁺-Lösung konstanter Konzentration (1.83 mM). Danach wurden 20 µL einer 208 nM ADH-Lösung sowie 10 µL der entsprechenden Inhibitor-Lösungen konstanter Konzentrationen (4.24 mM Clip **606**; 1.2 mM Clip **622**; 408 µM Tweezer **734**; 232 µM Tweezer **750**) hinzu gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µL einer Ethanol-Lösung konstanter Konzentration (1.18 mg/mL) bzw. unterschiedlicher Konzentration (0.789 - 7.89 mg/mL) gestartet. Das Gesamtvolumen betrug damit 250 µL/Well. Sobald die

Zugabe der Ethanol-Lösung erfolgte, wurde die ADH-Aktivität am ELISA-Reader über die mOD-Änderung bei 340 nm über einen Zeitraum von 10 Minuten verfolgt.

6.3.1.3 Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente

Die Durchführung der Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente erfolgte auf einer 96-Loch-Mikroplatte. Analog zu den vorherigen Assays wurden auch hier die Wells zunächst mit 178.5 μL Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer (75 mM/22.2 mM, pH = 9.0) befüllt. Anschließend wurden 7.5 μL einer 2.2 M Semicarbazid Hydrochlorid-Lösung und 7.5 μL einer 300 mM Glutathion-Lösung dazu pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 16.5 μL einer NAD^+ -Lösung konstanter Konzentration (1.83 mM), gefolgt von 20 μL einer 208 nM ADH-Lösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL einer Ethanol-Lösung konstanter Konzentration (1.18 mg/mL) gestartet. Nach einer Inkubationszeit von ca. zwei Minuten wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 μL des jeweiligen Inhibitors (2.74 mM Clip **606**; 1.46 mM Clip **622**; 1.05 mM Tweezer **750**) gestoppt. Danach wurde die Platte erneut zwei Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor 10 μL der entsprechenden Konkurrenz-Molekül-Lösung (3.66-9.14 mM NAD^+ ; 1.83-9.14 mM *N*-Methylnikotinamidiodid (NMNA); 1.83-18.3 mM 2'-Deoxycytidin (DC); 3.66-18.3 mM Ac-Lys-OMe, 1.83-3.66 mM H-KKKK-OH) dazu pipettiert wurden. Nach einer weiteren Inkubationszeit von ca. zwei Minuten wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 μL der entsprechenden Inhibitor-Lösung (Clip **606** 3.84 mM; Clip **622** 5.48 mM; Tweezer **750** 4.39 mM) vollständig gestoppt. Alle Messungen wurden am ELISA-Reader bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm durchgeführt.

6.3.1.4 Durchführung einer nicht-denaturierenden Gel-Elektrophorese

Die einzelnen Wells der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese enthielten folgende Zusammensetzungen. Im ersten Well des Gels wurden 30 μL 191 μM ADH vorgelegt und mit 3 μL Xylenecyanol+Ficoll-400 versetzt. Das zweite Well enthielt 30 μL 66.4 mM Inhibitor-Lösung und 3 μL Xylenecyanol+Ficoll-400. Die entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplex-Lösungen setzten sich aus 15 μL 95.5 μM ADH, 15 μL 33.2 mM der jeweiligen Inhibitor-Lösung und ebenfalls 3 μL Xylenecyanol+Ficoll-400 zusammen.

6.3.2 Enzymkinetische Untersuchungen im Rahmen des G6PD-Projektes

6.3.2.1 Durchführung der ITC-Experimente

Die ITC-Experimente wurden an einem VP-ITC Instrument bei einer Referenz-Stärke von 10 $\mu\text{cal/s}$ und einer Temperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Wirt (1–900 μM) in der Messzelle vorgelegt. Die Zugabe des Gastes (0.1–17 mM) erfolgte über eine Spritze in 10 μL -Portionen. Die erste Portion enthielt dabei nur 5 μL Gast. Zwischen den einzelnen Titrationsschritten wurde jeweils 360 s gewartet. Um während der gesamten Messzeit eine konstante Wirt-Konzentration gewährleisten zu können, wurde der Gast in der Wirt-Stammlösung gelöst.

6.3.3 Enzymkinetische Untersuchungen im Rahmen des PARP-1-Projektes

6.3.3.1 Durchführung des PARP-1-Assay-Kits nach Trevigen[®]

Der für den Assay benötigte PBS-Puffer bestand aus 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 und 1 mL Triton X-100 mit einem pH-Wert von 7.4. Bevor mit der eigentlichen Durchführung begonnen werden konnte, mussten die verschiedenen Reagenzien des PARP-1-Assay-Kits gemäß der Vorschrift von Trevigen[®] vorbereitet werden. Dazu wurde zunächst das 10xStrep-Diluent, das als Verdünnungsmittel für Strep-HRP diente, durch eine 1:10 Verdünnung mit PBS-Puffer in 1xStrep-Diluent umgewandelt. Danach wurde der 20xPARP-1-Puffer, der zur Verdünnung von PARP-1-HSA, PARP-1-Cocktail und der Inhibitoren diente, 1:20 mit bi-dist. Wasser verdünnt. Es resultierte der 1xPARP-1-Puffer. Der 10xPARP-1-Cocktail, der biotinoyliertes NAD^+ enthielt, setzte sich pro Well aus 2.5 μL 10xPARP-1 Cocktail, 2.5 μL 10xaktivierte DNA und 20 μL 1xPARP-1 Puffer zusammen. Anschließend wurden dem Enzym PARP-1-HSA (500 U, 10 U/ μL , 0.104 mg/mL) 7 μL entnommen und in 2.1 mL 1xPARP-1-Puffer verdünnt. Damit ergab sich eine Enzymkonzentration von 0.5 U/Well (2.28 nM/Well). Die Stammlösungen der einzelnen Inhibitoren wurden in 1xPARP-1-Puffer vorbereitet (0.1–50 mM **3-AB**; 0.1–1 mM Tweezer **750**; 0.5–5 mM Clip **622**). Das Strep-HRP wurde erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt. Dazu wurde es 1:500 mit 1xStrep-Diluent verdünnt. Nachdem alle Lösungen vorbereitet waren, wurde die Schutzfolie der 96-Loch-Mikroplatte entfernt und die einzelnen

Wells mit den entsprechenden Lösungen befüllt. Zuerst wurden 10 μL der entsprechenden Inhibitor-Stammlösungen vorgelegt. Darauf folgten 15 μL des Enzyms PARP-1-HSA und 25 μL 1xPARP-1-Cocktail. Das Gesamtvolumen jedes Wells betrug damit 50 μL . Ferner wurden Aktivitäts (+)- und Negativ (-)-Kontrollen innerhalb des Assays durchgeführt. Die Aktivitäts-Kontrollen, die einer 100%igen PARP-1-Aktivität entsprachen, enthielten statt 10 μL Inhibitor 10 μL 1xPARP-1 Puffer und die Negativ-Kontrollen, die einer 0%igen PARP-1-Aktivität entsprachen, enthielten stattdessen 25 μL 1xPARP-1-Puffer und 25 μL 10xPARP-1-Cocktail. Nach erfolgter Zugabe wurde die 96-Loch-Mikroplatte 1 h lang bei RT inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Wells viermal mit je 100 μL /Well PBS-Puffer gründlich gewaschen. Nach Zugabe von 50 μL Strep-HRP pro Well wurde die 96-Loch-Mikroplatte erneut 1 h lang inkubiert. Danach wurden die Wells wieder viermal mit je 100 μL /Well PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 50 μL TACS-Sapphire pro Well und weiteren 15-30 Minuten Inkubationszeit, wurde die 96-Loch-Mikroplatte schließlich am UV/Vis-Gerät bei einem Absorptionsmaximum von 630 nm vermessen. Durch Zugabe von 50 μL 0.2 M HCl pro Well wurde die Reaktion unter Ausbildung des stabileren gelben Farbstoffes gestoppt. Dieser besaß ein Absorptionsmaximum bei 450 nm.

6.3.3.2 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Es wurden 20 μL einer 250 nM NAD^+ -Lösung, 10 μL einer aktivierten DNA-Lösung (50 $\mu\text{g/mL}$) und 10 μL der Inhibitoren unterschiedlicher Konzentrationen (100 nM-100 mM) in die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte gegeben. Durch Zugabe von 10 μL PARP-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) wurde die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung gestartet. Die Endkonzentrationen betrugen damit 2 $\mu\text{g/mL}$ PARP-1, 10 $\mu\text{g/mL}$ DNA, 100 nM NAD^+ und Inhibitor unterschiedlicher Konzentrationen (20 nM-20 mM). Die Platte wurde 15 Minuten lang bei RT inkubiert. Anschließend wurden 20 μL einer wässrigen 2 M KOH-Lösung und 20 μL einer 20%igen Acetophenon-Lösung in Ethanol dazu pipettiert. Danach wurde die Platte 10 Minuten lang bei 4 °C stehen gelassen. Nach Zugabe von 90 μL 88%iger Ameisensäure wurde die Platte 5 Minuten lang im Ofen bei 110 °C erhitzt. Nachdem diese abgekühlt war, konnte diese bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission von 445 nm vermessen werden. Die erhaltenen FI-Werte wurden anschließend mit den Kontroll-FI-Werten in Beziehung gesetzt, um so eine prozentuale Aussage bzgl. der Effektivität der untersuchten PARP-1-Inhibitoren treffen zu können. Bei den Kontroll-FI-Werten handelte es sich dabei sowohl um Aktivitäts- als auch um Negativ-Kontrollen. Die Aktivitäts-Kontrollen (+) enthielten PARP-1 und NAD^+

ohne Inhibitor und entsprachen einer 100%igen PARP-1-Aktivität. Die Negativ-Kontrollen (-) enthielten dagegen lediglich NAD^+ und entsprachen damit einer 0%igen PARP-1-Aktivität.

6.3.3.3 Bestimmung der NAD^+ -Kalibrierungskurve

Es wurden 50 μL einer NAD^+ -Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (1-100 nM) in PARP-1-Puffer in die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte vorgelegt. Anschließend wurden 20 μL einer wässrigen 2 M KOH-Lösung und 20 μL einer 20%igen Acetophenon-Lösung in Ethanol dazu pipettiert. Nach zehnminütiger Inkubation der Platte bei 4 °C wurden 90 μL 88%ige Ameisensäure dazugegeben. Anschließend wurde die Platte 5 Minuten lang im Ofen bei 110 °C erhitzt. Nachdem diese abgekühlt war, konnte diese direkt am Fluoreszenzgerät vermessen werden. Die Anregung erfolgte bei 360 nm und die Emission bei 445nm.

6.3.3.4 Bestimmung der Lineweaver-Burk-Plots

In die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte wurden nacheinander 20 μL einer NAD^+ -Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (60-500 nM), 10 μL einer DNA-Lösung (50 $\mu\text{g/mL}$), und 10 μL Inhibitor-Lösung (25 μM **750**; 250 μM **622**) pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL PARP-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) gestartet. Die Assay-Konzentrationen betrugen damit 2 $\mu\text{g/mL}$ PARP-1, 10 $\mu\text{g/mL}$ aktivierter DNA, 5 μM **750**, 50 μM **622**, 5 μM **BA** und NAD^+ unterschiedlicher Konzentrationen. Nach erfolgter Zugabe wurde die 96-Loch-Mikroplatte 15 Minuten lang bei RT inkubiert. Danach erfolgte die übliche Aufarbeitung.

6.3.3.5 Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente

6.3.3.5.1 Einfluss der Komponenten Tweezer 750 und Ac-Lys-OMe

Dazu wurden in die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte nacheinander 10 μL NAD^+ -Lösung, (500 nM), 10 μL DNA-Lösung (50 $\mu\text{g/mL}$), 10 μL Inhibitor-Lösung (100 μM Tweezer **750**) und 10 μL Ac-Lys-OMe-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (600-4800 μM) pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL PARP-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) gestartet. Die Assay-Konzentrationen betrugen damit 100 nM NAD^+ , 10 $\mu\text{g/mL}$ aktivierte DNA, 20 μM **750**,

120-960 μM Ac-Lys-OMe und 2 $\mu\text{g/mL}$ PARP-1. Die Platte wurde 15 Minuten lang bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die übliche Aufarbeitung. Die Messung wurde insgesamt dreimal wiederholt und die Mittelwerte gebildet.

6.3.3.5.2 Einfluss der Komponenten Tweezer 750 und DNA

Die Durchführung erfolgte analog zu der vorherigen. Es wurden in die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte nacheinander 10 μL NAD^+ -Lösung, (500 nM), 10 μL aktivierte DNA-Lösung (50 $\mu\text{g/mL}$), 10 μL Inhibitor-Lösung (50 μM Tweezer **750**) und 10 μL Puffer bzw. 10 μL DNA-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (0.5-50 $\mu\text{g/mL}$) pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL PARP-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) gestartet. Die Assay-Konzentrationen betrugen damit 100 nM NAD^+ , 10 μM **750**, (0.1-10 $\mu\text{g/mL}$) aktivierte DNA und 2 $\mu\text{g/mL}$ PARP-1. Die Platte wurde 15 Minuten lang bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die übliche Aufarbeitung. Die Messung wurde insgesamt zweimal wiederholt und die Mittelwerte gebildet.

6.3.3.5.3 Einfluss der Komponenten Clip 622 und 2'-Deoxycytidin

In die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte wurden nacheinander 10 μL NAD^+ -Lösung, (500 nM), 10 μL DNA-Lösung (50 $\mu\text{g/mL}$), 10 μL Inhibitor-Lösung (1 mM Clip **622**) und 10 μL 2'-Deoxycytidin-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (2.5-10 mM) pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL PARP-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) gestartet. Die Assay-Konzentrationen betrugen damit 100 nM NAD^+ , 10 $\mu\text{g/mL}$ aktivierte DNA, 200 μM **622**, 500-2000 μM 2'-Deoxycytidin und 2 $\mu\text{g/mL}$ PARP-1. Die Platte wurde 15 Minuten lang bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die übliche Aufarbeitung. Die Messung wurde insgesamt zweimal wiederholt und die Mittelwerte gebildet.

6.3.3.6 Überprüfung eines synergistischen Effekts

Dazu wurden 20 μL einer 250 nM NAD^+ -Lösung, 10 μL einer aktivierten DNA-Lösung (50 $\mu\text{g/mL}$) und 10 μL einer gemischten Inhibitor-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (500 nM – 200 μM) in die Wells einer 96-Loch-Mikroplatte gegeben. Durch Zugabe von

10 μL PARP-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) wurde die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung gestartet. Die Endkonzentrationen betrugen damit 2 $\mu\text{g/mL}$ PARP-1, 10 $\mu\text{g/mL}$ DNA, 100 nM NAD^+ und Inhibitor unterschiedlicher Konzentrationen (100 nM – 40 μM). Die Aufarbeitung und Auswertung erfolgte analog zu den zuvor durchgeführten Inhibitions- und Reaktivierungsexperimenten.

6.3.3.7 Generierung der DNA

Dazu wurden die beiden von der Firma Metabion[®] bezogenen lyophilisierten 20-er DNA-Einzelstränge in Tris-Puffer gelöst, so dass sich für jeden Einzelstrang eine 100 μM Lösung ergab. Von diesen beiden DNA-Einzelstrang-Lösungen wurde dann jeweils der gleiche Volumenanteil entnommen und miteinander vereinigt, so dass die Endkonzentration 50 μM betrug. Nachdem die DNA-Lösung 5 Minuten lang bei 90 °C im Thermomixer behandelt wurde, ließ man diese langsam auf RT abkühlen.

6.3.3.8 Durchführung des Ultrafiltrationsexperimentes

Die Durchführung des Ultrafiltrationsexperimentes erfolgte analog zu der der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Auch hier wurden Centricons (Cut Off Filtern) mit einer Porengröße von 30 kDa verwendet. Zunächst wurde die Permeabilität der fluoreszenzmarkierten „aktivierten“ DNA2 in einem Kontrollexperiment überprüft. Dazu wurde das erste Centricon mit 20 μL „aktivierter“ DNA2 (330 nM) befüllt. Anschließend wurden 180 μL Tris-Puffer dazugegeben und die Ultrafiltration gestartet. Nach ca. 15 Minuten war die Filtration beendet. Die Membran des Filters wurde noch einmal mit 400 μL und einmal mit 200 μL Tris-Puffer nach gewaschen. Das Gesamtvolumen des Filtrats betrug damit 800 μL . Anschließend wurde das Filtrat fluoreszenzspektroskopisch auf die „aktivierte“ DNA2 hin untersucht. Die Anregung erfolgte bei 485 nm. Bei einer Wellenlänge von 520 nm konnte eine Fluoreszenzintensität von 38 detektiert werden. Dieser FI-Wert diente als Referenz für die folgenden zwei Messungen, da wie bereits erwähnt wurde, die Konzentrationen aller Komponenten stets konstant blieben. Anschließend wurde das System bestehend aus „aktivierter“ DNA2, Tweezer **750** und PARP-1 untersucht. Dazu wurden zunächst 10 μL DNA2 (660 nM) und Tweezer **750** (200 μM) mit 10 μL PARP-1 (920 nM) in einem Eppendorfgefäß 15 Minuten lang inkubiert. Die Endkonzentrationen betrugen damit

330 nM DNA2, 100 μ M Tweezer **750** und 460 nM PARP-1. Nach der Inkubation wurde die Lösung in das Centricon überführt, mit 180 μ L Tris-Puffer bedeckt und zentrifugiert. Wie zuvor wurde auch hier die Membran des Filters noch einmal mit 400 μ L und einmal mit 200 μ L Tris-Puffer nach gewaschen, so dass das Gesamtvolumen des Filtrats 800 μ L betrug. Die anschließende fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des Filtrats ergab einen FI-Wert von 23, der mit dem Referenz-FI-Wert von 38 in Beziehung gesetzt wurde. Da der Tweezer **750** selbst über eine charakteristische Fluoreszenzintensität bei 334 nm bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm verfügt, konnte diese zu dessen fluoreszenzspektroskopischen Nachweis herangezogen werden. Das Filtrat weist allerdings nur bei 305 nm und nicht bei 334 nm eine Fluoreszenzintensität auf. Diese Fluoreszenzintensität bei 305 nm ist dagegen dem Enzym PARP-1 zuzuordnen. Diese Emission ist auf die Anregung der Tryptophane, die ebenfalls bei 280 nm erfolgt, zurückzuführen. Zur Kontrolle wurde eine Tweezer-Lösung mit der Konzentration, die im Filtrat vorliegt, vorbereitet. Dessen fluoreszenzspektroskopische Untersuchung zeigt die für den Tweezer **750** charakteristische Fluoreszenzintensität bei 334 nm. Die zuvor beobachtete Fluoreszenzintensität bei 305 nm, die dem Enzym zugeordnet werden konnte, ist dagegen verschwunden. Zuletzt wurde das System bestehend aus „aktivierter“ DNA2 und PARP-1 untersucht. Dazu wurden zunächst 10 μ L DNA2 (660 nM) mit 10 μ L PARP-1 (920 nM) in einem Eppendorfgefäß 15 Minuten lang inkubiert. Die Endkonzentrationen betrugen damit 330 nM DNA2 und 460 nM PARP-1. Die Durchführung erfolgte analog zu den vorherigen Versuchen. Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des Filtrats ergab einen FI-Wert von 13. Wenn man diesen mit dem Referenzwert von 38 in Beziehung setzt, dann geht daraus hervor, dass etwa noch 29% der ursprünglichen DNA2 die Membran passiert haben.

6.3.3.9 Durchführung des Dialyseexperimentes

Wie zuvor im Fall des Ultrafiltrationsexperimentes wurde auch hier zunächst ein Kontrollexperiment mit der „aktivierten“ DNA2 alleine durchgeführt. Dazu wurden 10 μ L DNA2 (660 nM) und 10 μ L Tris-Puffer in einem Dialysegefäß vorgelegt. Die Endkonzentration betrug damit 330 nM an DNA2. Anschließend wurde das Dialysegefäß in einen Behälter mit 800 μ L Tris-Puffer gestellt und 24 h lang bei 4 °C in Dunkelheit dialysiert. Danach wurde das Filtrat fluoreszenzspektroskopisch analysiert, wobei die Anregung wieder bei 485 nm und die Emission bei 520 nm erfolgte. Für die reine DNA2 konnte im Filtrat ein

FI-Wert von 17.7 nachgewiesen werden. Als nächstes wurde das System bestehend aus DNA2 und PARP-1 einmal in Anwesenheit und einmal in Abwesenheit des Inhibitors untersucht. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten wurden analog zu denen des Ultrafiltrationsexperimentes gewählt. Während im ersten Dialysegefäß 10 µL „aktivierte“ DNA2 (660 nM) und Tweezer **750** (200 µM) mit 10 µL PARP-1 (920 nM) inkubiert wurden, enthielt das zweite Dialysegefäß 10 µL „aktivierte“ DNA2 (660 nM) und 10 µL PARP-1. Die Durchführung erfolgte analog zu der des Kontrollexperimentes. In Anwesenheit des Tweezers **750** konnte im Filtrat ein FI-Wert von 19.3 detektiert werden. In Abwesenheit des Inhibitors ergab sich dagegen ein FI-Wert von 10, der damit nur halb so groß war, wie der in Anwesenheit des Tweezers. Mit diesem Experiment konnte wie bereits zuvor mit dem Ultrafiltrationsexperiment der Enzym-Inhibitor-Komplex nachgewiesen werden. Im Filtrat ließ sich bei einer Anregung von 280 nm ebenfalls keine charakteristische Fluoreszenzintensität des Inhibitors bei 334 nm mehr detektieren.

6.4 Bestimmung der Assoziationskonstante K_a

Die Bestimmung der Assoziationskonstante K_a erfolgte sowohl mittels ^1H -NMR-Verdünnungstitration am Bruker DRX 500 als auch mittels Fluoreszenztitration am FP-6500-Spektrofluorometer der Firma Jasco. In den folgenden Abschnitten wird die Durchführung beider Methoden sowie die Auswertung der mit beiden Methoden gewonnenen experimentellen Daten näher erläutert.

6.4.1 Bestimmung der Assoziationskonstante K_a und der Komplex-induzierten ^1H -NMR-Verschiebungen $\Delta\delta_{\max}$ mittels ^1H -NMR-Titrationsexperimenten

Die magnetische Anisotropie der Areneinheiten aller hier untersuchten Rezeptormoleküle übt einen starken Einfluss auf die magnetische Umgebung aus. Genauso wie dies die chemische Verschiebung der Protonen der Substratmoleküle beeinflusst, beeinflusst die Anwesenheit des Substratmoleküls die chemische Verschiebung der Protonen des Rezeptormoleküls.^[25, 195, 210] Aus diesem Grund hat sich die ^1H -NMR-Spektroskopie als eine besonders hilfreiche Methode erwiesen, um Informationen über die Komplexierungseigenschaften von Rezeptoren zu erhalten. In einem Rezeptor-Substrat-Komplex hängt die chemische Verschiebung eines Substratprotons sowohl von seiner intramolekularen Position im Substrat, als auch von seiner Position relativ zur Rezeptorkavität ab. Wenn sich ein Proton im Anisotropiekegel der Areneinheiten befindet, dann wird es abgeschirmt und hochfeldverschoben. Befindet sich dagegen das Proton innerhalb der Ebene des Arensystems, dann wird es entschirmt und tieffeldverschoben. Beide Effekte basieren auf dem diamagnetischen Ringstromeffekt.^[211] Aufgrund der bei Komplexbildung erfahrungsgemäß stärkeren chemischen Verschiebung der Substratprotonen verglichen mit den Rezeptorprotonen, erfolgt die Auswertung eines ^1H -NMR-Titrationsexperimentes hauptsächlich über die chemischen Verschiebungen der Substratsignale. Mit Hilfe der maximalen Komplex-induzierten Verschiebung $\Delta\delta_{\max}$, deren Bestimmung durch ^1H -NMR-Titration für verschiedene Protonen möglich ist, lässt sich sogar ein qualitativer Einblick in die Komplexgeometrie gewinnen. Die Assoziationskonstante K_a ergibt sich schließlich aus der Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom Verhältnis von Rezeptor zu Substrat. Da die Komplexbildung und die Komplexdissoziation gegenüber

der „NMR-Zeitskala“ schnell erfolgen, können nur die gemittelten Signale von freiem und komplexiertem Substrat beobachtet werden.

Die Abhängigkeit der Komplex-induzierten Hochfeldverschiebung $\Delta\delta_{\text{obs}}$ von der Assoziationskonstante K_a wird durch Gleichung 23 beschrieben:

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\Delta\delta_{\text{max}}}{[S]_0} \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot \left([R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \cdot \left([R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - [R]_0 \cdot [S]_0} \right) \quad (23)$$

6.4.2 Durchführung einer ^1H -NMR-Verdünnungstitration

Bei der Verdünnungstitration werden Rezeptor und Substrat im 1:1-Molverhältnis eingewogen und in einer definierten Menge des verwendeten deuterierten Lösungsmittels gelöst. Diese Stammlösung wird zur Bereitung einer Verdünnungsreihe verwendet, wobei die Konzentration der Stammlösung als Startkonzentration dient, von der durch Verdünnung mit dem verwendeten Lösungsmittel fünf weitere Konzentrationen eingestellt werden, die sich je um Faktor zwei unterschieden. Nach jedem Titrationsschritt erfolgt die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums.

6.4.3 Bestimmung der Assoziationskonstante K_a mittels Fluoreszenztitration

Grundsätzlich kann die komplexierungsbedingte Änderung jeder physikalischen Größe zur Bestimmung der Assoziationskonstante des Komplexes herangezogen werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren besitzen Naphthalin- bzw. Benzoleinheiten, welche nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 280 nm eine intensive Emissionsbande bei 340 nm zeigen. Die Intensitätsänderung ΔI_{obs} dieser Bande, welche sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Komplexbildung zurückführen lässt, kann daher auch zur Bestimmung der Assoziationskonstante des Wirt-Gast-Komplexes herangezogen werden. Die Abhängigkeit der beobachteten Intensitätsänderung ΔI_{obs} von der Assoziationskonstante K_a beschreibt Gleichung 24.

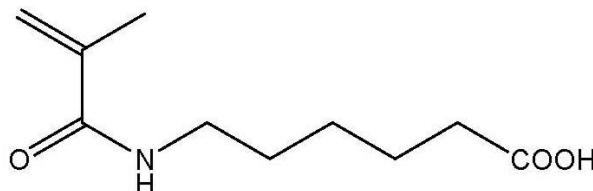
$$\Delta I_{obs} = \frac{\Delta I_{max}}{[S]_0} \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot \left([R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \cdot \left([R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - [R]_0 \cdot [S]_0} \right) \quad (24)$$

6.4.4 Durchführung einer spektrofluorimetrischen Titration

Ein definiertes Volumen einer Lösung der Komponente A wird in der Fluoreszenzküvette vorgelegt. Zu diesem wird sukzessive ein definiertes Volumen einer Lösung der Komponente B des Komponentengemisches in der Lösung der Komponente A dazu titriert. Dadurch wird die Konzentration der Komponente A, deren Fluoreszenzänderung beobachtet wird, konstant gehalten. Nach jedem Titrationsschritt wird ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen und die Intensitätsänderung der Fluoreszenzbande detektiert. Die Ermittlung der Assoziationskonstante K_a geschieht durch nichtlineare Extrapolation der Datenpaare aus der beobachteten Intensitätsänderung und dem Verhältnis aus den Anfangskonzentrationen von Substrat und Rezeptor (ΔI_{obs} vs. $[S]_0 \cdot [R]_0^{-1}$) nach Gleichung 23 mit Hilfe des Programms Sigmaplot 9.0.^[212]

6.5 Synthese Polymerisierfähiger Tweezer und Clips

6.5.1 Synthese von *N*-Methacryloyl-6-aminocaprinsäure (3**)^[197]**

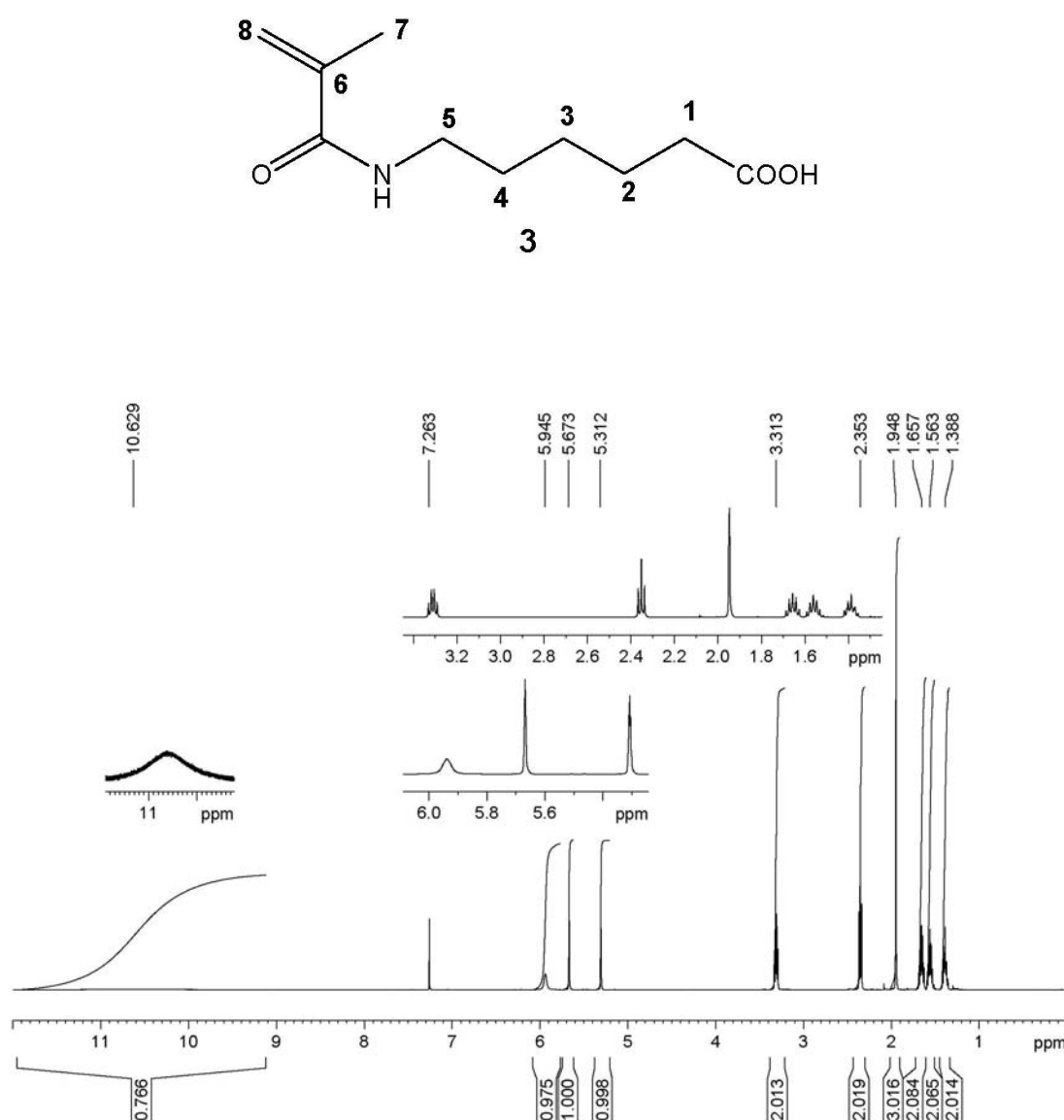


3

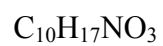
In einem 250 mL-Einhalskolben wurden 6.6 g (0.05 mol) 6-Aminohexansäure (**1**) in 150 mL Eisessig gelöst. Zu dieser Lösung wurden langsam bei RT 8.7 mL (9.0 g, 0.06 mol) Methacrylsäureanhydrid (**1**) getropft. Die klare Lösung wurde 12 h lang bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abkondensiert und man erhielt ein farbloses Öl als Rohprodukt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit Chloroform/Methanol (v/v 95:5). Das erhaltene farblose Öl **3** wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **3**: 4.7 g (0.02 mol, 47%); Schmp: 53 °C

Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.



Molmassenfeinbestimmung:

 $m/z [\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 200.1281

gef. 200.1288

 $m/z [\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 222.1101

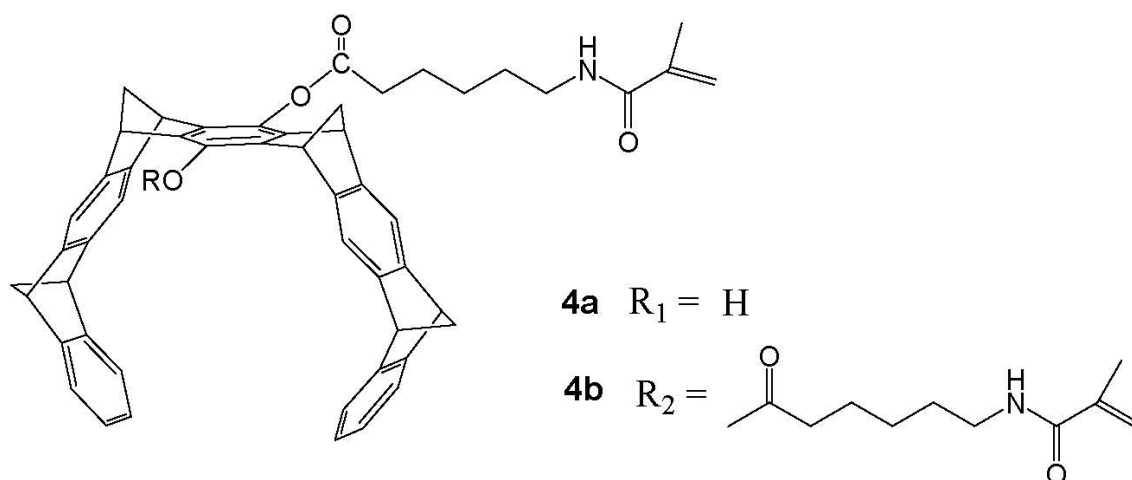
gef. 222.1093

 $m/z [\text{M}-\text{H}]^-$:

ber. 198.1136

gef. 198.1138

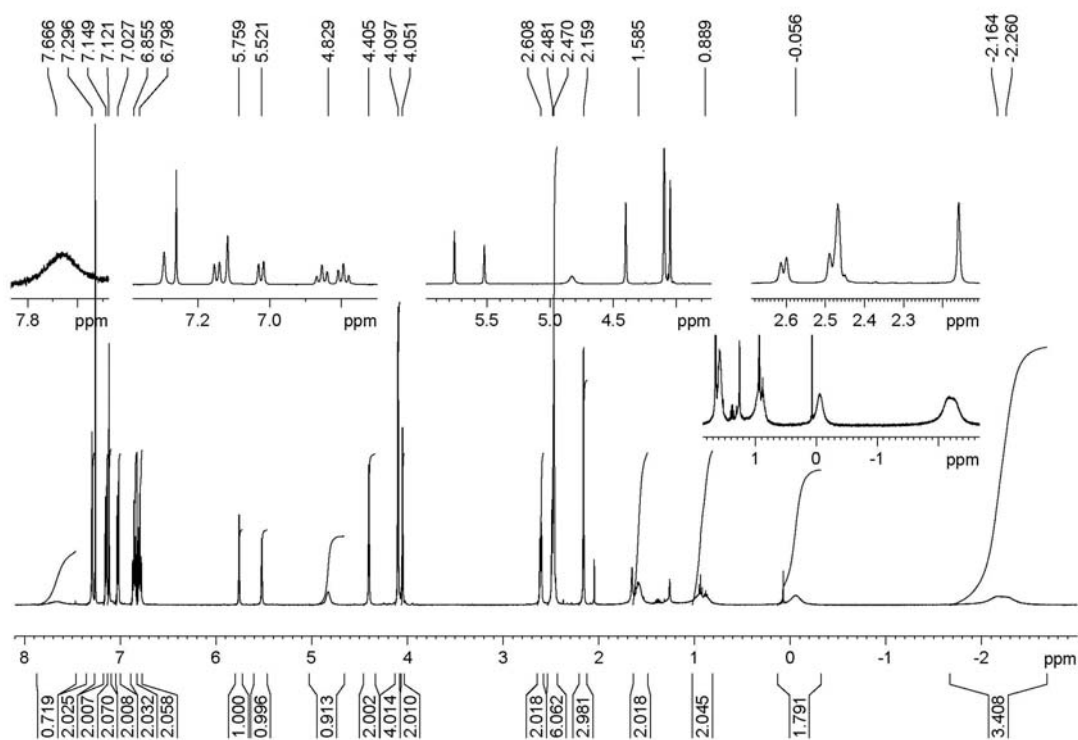
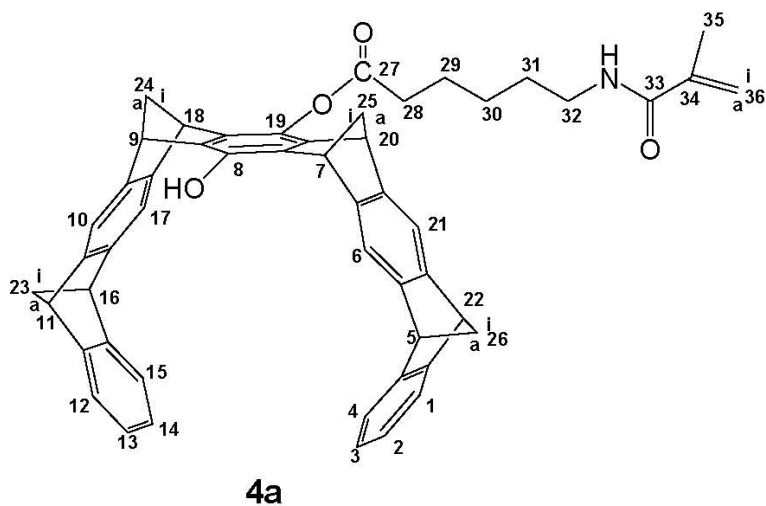
6.5.2 Veresterung der *N*-Methacryloyl-6-aminocaprinsäure (**3**) mit dem Bis-Hydroxy-Tweezer **29S** zu **4a** und **4b**



In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 36.0 mg (0.18 mmol) *N*-Methacryloyl-aminocaprinsäure (**3**) in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurden bei RT 94.0 mg (0.18 mmol) PyBOP und nach weiteren 15 Minuten 55.5 mg (60 μL , 0.55 mmol) *N*-Methylmorpholin gegeben. Die klare Lösung wurde auf 40 °C erwärmt. Parallel dazu wurden unter Argon 102.0 mg (0.18 mmol) Bis-Hydroxy-Tweezer **29S** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und ebenfalls auf 40 °C erhitzt. Diese Reaktionslösung wurde langsam mit dem ersten Reaktionsgemisch versetzt und 48 h lang bei 40 °C gerührt. Danach wurde die schwach orangefarbene Lösung vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan (v/v 1:1) gereinigt. Man erhielt das monosubstituierte Produkt **4a** ($R_F = 0.36$) als farblosen kristallinen Feststoff. Anschließend wurde das Laufmittelgemisch auf (v/v 40:1) verdünnt, um das bisubstituierte Produkt **4b** ($R_F = 0.37$) zu isolieren.

Ausbeute an **4a**: 49.2 mg (0.07 mmol, 47%); Schmp: 301 °C

Ausbeute an **4b**: 48.5 mg (0.05 mmol, 29%); Schmp: 269 °C



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = -2.26 (br, 2 H, H-30), -2.16 (br, 2 H, H-31), -0.06 (br, 2 H, H-29), 0.89 (br, 2 H, H-32), 1.59 (br, 2 H, H-28), 2.16 (s, 3 H, H-35), 2.47 (m, 4 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a), 2.48 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.61 (dt, 2 H, H-24i, H-25i), 4.05 (t, 2 H, H-16, H-22), 4.10 (t, 4 H, H-5, H-7, H-9, H-11), 4.41 (t, 2 H, H-18, H-20), 4.83 (t(br), NH), 5.52 (s, 1 H, H-36i), 5.76 (s, 1 H, H-36a), 6.79 (dd, 2 H, H-3, H-13), 6.86 (dd, 2 H, H-2, H-14), 7.03 (d, 2 H, H-4, H-12), 7.12 (s, 2 H, H-6, H-10), 7.14 (d, 2 H, H-1, H-15), 7.30 (s, 2 H, H-17, H-21), 7.66 (s(br), OH)

^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO, 298K): δ [ppm] = 1.41 (m, 2 H, H-30), 1.56 (m, 2 H, H-31), 1.73 (m, 2 H, H-29), 1.86 (s, 3 H, H-35), 2.20 (dt, 4 H, H-24a, 24i, 25a, 25i), 2.28 (m, 4 H, H-23a, 23i, 26a, 26i), 2.59 (t, 2 H, H-28), 3.19 (q, 2 H, H-32), 3.85 (t, 2 H, H-16, H-22), 4.06 (t, 4 H, H-5, H-7, H-9, H-11), 4.26 (t, 2 H, H-18, H-20), 5.32 (s, 1 H, H-36i), 5.67 (s, 1 H, H-36a), 6.78 (m, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.04 (d, 2 H, H-1, H-15), 7.06 (m, 4 H, H-4, H-6, H-10, H-12), 7.09 (d, 2 H, H-17, H-21), 7.98 (t(br), 1 H, NH), 8.63 (s, 1 H, OH)

^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3 , 248K): δ [ppm] = -2.46 (br, 2 H, H-30), -2.35 (br, 2 H, H-31), -0.13 (br, 2 H, H-29), 0.87 (br, 2 H, H-32), 1.55 (br, 2 H, H-28), 2.17 (s, 3 H, H-35), 2.46 (m, 4 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a), 2.50 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.61 (dt, 2 H, H-24i, H-25i), 4.07 (t, 2 H, H-16, H-22), 4.10 (t, 4 H, H-5, H-7, H-9, H-11), 4.42 (t, 2 H, H-18, H-20), 4.83 (t, NH), 5.56 (s, 1 H, H-36i), 5.79 (s, 1 H, H-36a), 6.81 (dd, 2 H, H-3, H-13), 6.87 (dd, 2 H, H-2, H-14), 7.03 (d, 2 H, H-4, H-12), 7.13 (s, 2 H, H-6, H-10), 7.14 (d, 2 H, H-1, H-15), 7.30 (s, 2 H, H-17, H-21), 8.03 (s, OH)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 19.2 (C-35), 24.2 (br, C-30), 24.3 (C-29), 25.5 (br, C-31), 34.3 (C-28), 39.2 (C-32), 47.8 (C-18, C-20), 48.9 (C-7, C-9), 51.2 (C-16, C-22), 51.3 (C-5, C-11), 68.4 (C-23, C-26), 69.3 (C-24, C-25), 116.8 (C-17, C-21), 117.0 (C-6, C-10), 119.4 (C-36), 120.8 (C-4, C-12), 122.4 (C-1, C-15), 124.4 (C-3, C-13), 125.2 (C-2, C-14), 140.4 (C-5a, C-10a, C-16a, C-21a,), 140.9 (C-34), 143.2 (C-7a, C-8a, C-18a, C-19a), 147.1 (C-6a, C-9a, C-17a, C-20a), 147.5 (C-8, C-19), 151.0 (C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 168.3 (CONH), 172.3 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3419, 3377 cm^{-1} (-OH, -CONH), 3064 (-C=CH₂), 2973, 2934, 2861 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1755 (-C=O), 1655 (-C=C, -C=O, -CONH Amid I), 1617 (Ringschwingung), 1525 (-CONH Amid II), 1453 (-CH₂, -CH₃), 1276 (-CONH Amid I), 1136 (-COO), 833 (=C-H)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{52}\text{H}_{45}\text{NO}_4$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

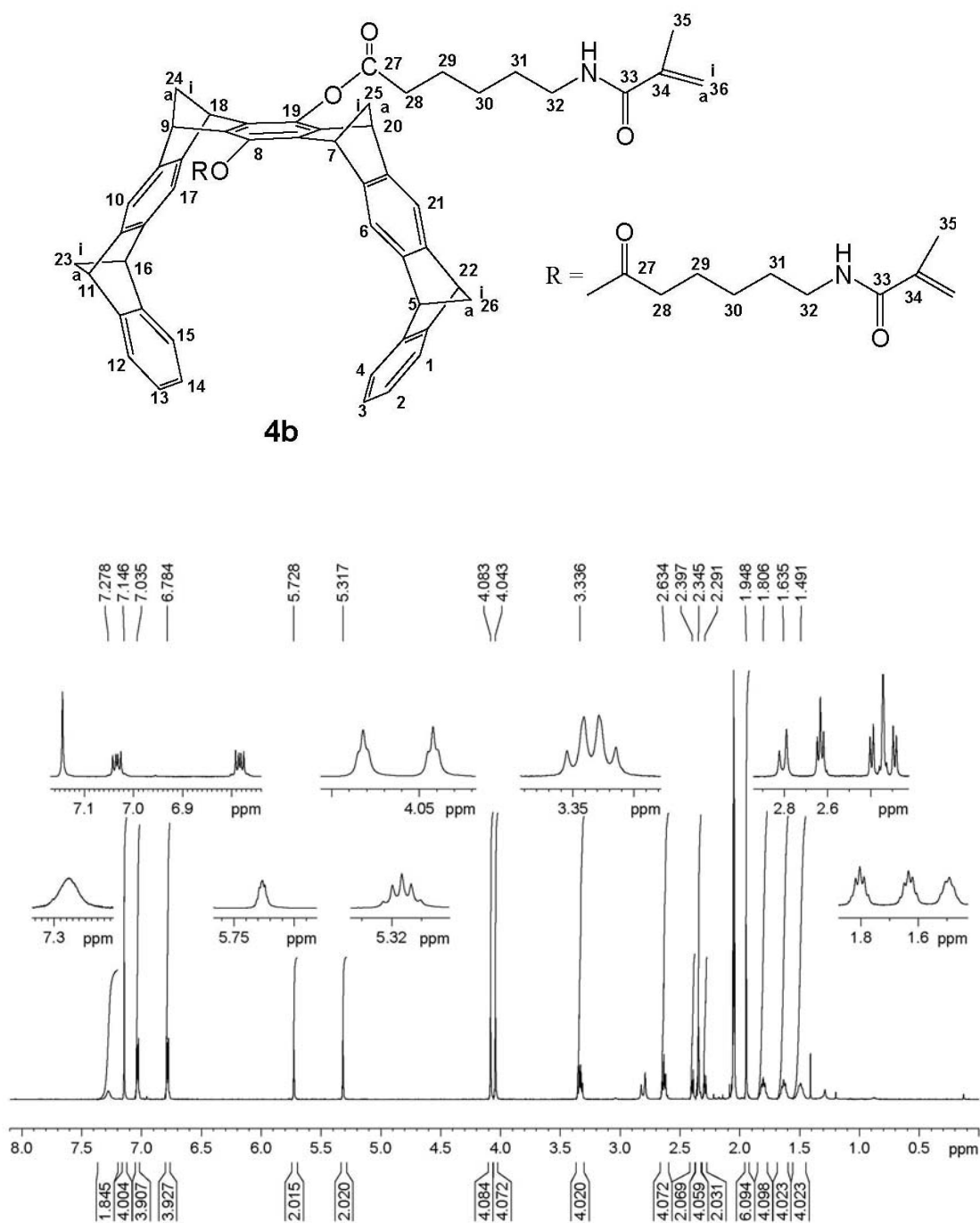
ber. 748.3421

gef. 748.3405

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 770.3241

gef. 770.3249



¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, Aceton-d₆): δ [ppm] = 1.49 (m, 4 H, H-30), 1.64 (m, 4 H, H-31), 1.81 (m, 4 H, H-29), 1.95 (s, 6 H, H-35), 2.29 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.35 (m, 4 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a), 2.40 (dt, 2 H, H-24i, H-25i), 2.63 (t, 4 H, H-28), 3.34 (q, 4 H, H-32), 4.04 (t, 4 H, H-7, H-9, H-18, H-20), 4.08 (t, 4 H, H-5, H-11, H-16, H-22), 5.32 (s, 2 H, H-36i), 5.73 (s, 2 H, H-36a), 6.78 (m, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.04 (m, 4 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.15 (s, 4 H, H-6, H-10, H-17, H-21), 7.28 (t(br), 2 H, NH)

^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 1.44 (m, 4 H, H-30), 1.56 (m, 4 H, H-31), 1.76 (m, 4 H, H-29), 1.86 (s, 6 H, H-35), 2.24-2.28 (m, 8 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a, H-24i, H-24a, H-25i, H-25a), 2.67 (t, 4 H, H-28), 3.19 (q, 4 H, H-32), 3.97 (t, 4 H, H-5, H-11, H-16, H-22), 4.07 (t, 4 H, H-7, H-9, H-18, H-20), 5.31 (s, 2 H, H-36i), 5.66 (s, 2 H, H-36a), 6.78 (dd, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.06 (m, 4 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.09 (s, 4 H, H-6, H-10, H-17, H-21), 7.98 (t(br), 2 H, NH)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 19.0 (C-35), 25.5 (C-29), 27.2 (C-30), 30.1 (C-31), 34.5 (C-28), 39.9 (C-32), 49.3 (C-7, C-9, C-18, C-20), 51.8 (C-5, C-11, C-16, C-22), 68.8 (C-23, C-26), 69.5 (C-24, C-25), 117.4 (C-6, C-10, C-17, C-21), 118.6 (C-36), 122.2 (C-1, C-4, C-12, C-15), 125.5 (C-2, C-3, C-13, C-14), 137.7 (C-8, C-19), 141.9 (C-34), 142.5 (C-7a, C-8a, C-18a, C-19a), 147.4 (C-5a, C-10a), 148.4 (C-16a, C-21a), 148.7 (C-4a, C-11a), 151.3 (C-15a, C-22a), 168.3 (CONH), 171.9 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3432 cm^{-1} (-CONH), 3065 (-C=CH₂), 2976, 2935, 2861 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1745 (-C=O), 1661 (-C=C, -C=O, -CONH Amid I), 1621 (Ringschwingung), 1526 (-CONH Amid II), 1455 (-CH₂, -CH₃), 1275 (-CONH Amid I), 1144 (-COO), 834 (=C-H)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{62}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_6$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 929.4524

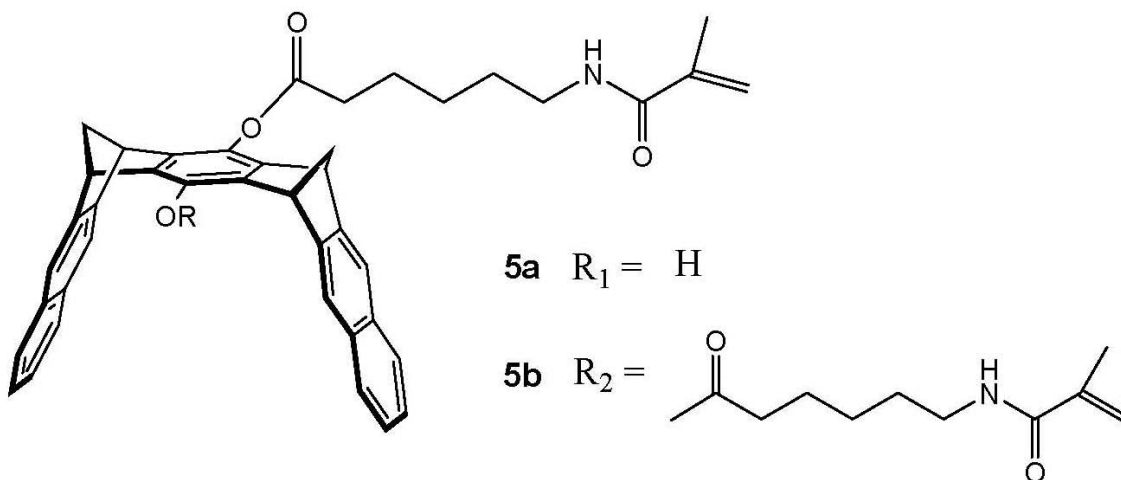
gef. 929.4599

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 951.4344

gef. 951.4347

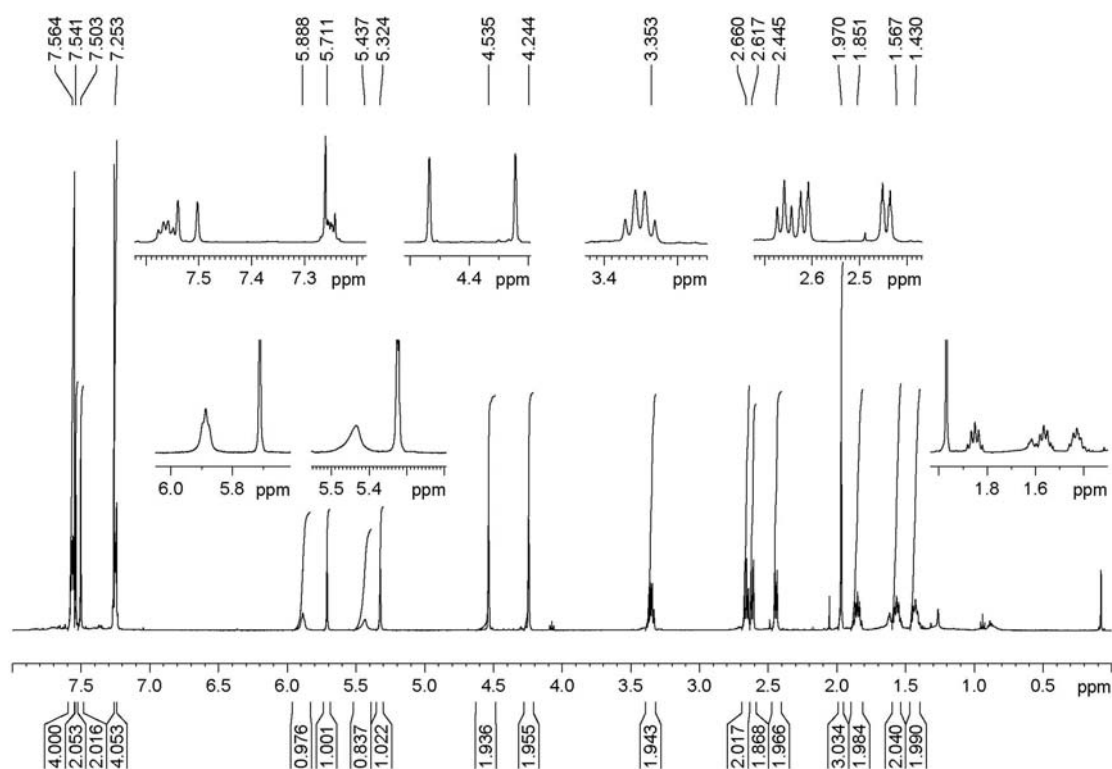
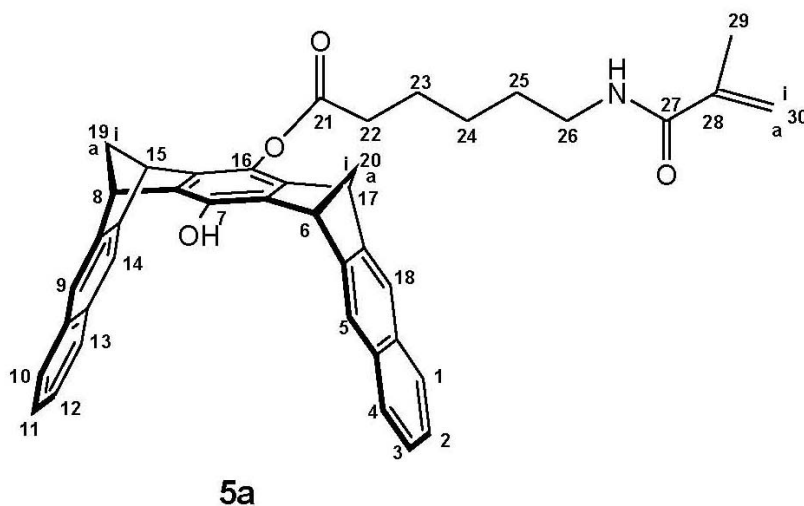
6.5.3 Veresterung der *N*-Methacryloyl-6-aminocaprinsäure (**3**) mit dem Bis-Hydroxy-Clip **13S** zu **5a** und **5b**



In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 45.6 mg (0.23 mmol) *N*-Methacryloyl-aminocaprinsäure (**3**) in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und anschließend bei RT mit 119.0 mg (0.23 mmol) PyBOP versetzt. Nach weiteren 15 Minuten wurden 70.0 mg (76 μ L, 0.69 mmol) *N*-Methylmorpholin dazugegeben. Die klare Lösung wurde auf 40 °C erwärmt. In einem anderen Stickstoffkolben wurden unter Argon 102.0 mg (0.23 mmol) Bis-Hydroxy-Clip **13S** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und ebenfalls auf 40 °C erhitzt. Zu dieser Lösung wurde langsam das erste Reaktionsgemisch getropft. Die zunächst farblose Reaktionsmischung wurde 48 h lang bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan (v/v 1:1) gereinigt. Auf diese Weise konnte das monosubstituierte Produkt **5a** ($R_F = 0.43$) als brauner Feststoff isoliert werden. Anschließende Verdünnung des Laufmittelgemisches (v/v 40:1) lieferte das bisubstituierte Produkt **5b** ($R_F = 0.41$) als beigen Feststoff.

Ausbeute an **5a**: 52.0 mg (0.08 mmol, 60%); Schmp: 132 °C

Ausbeute an **5b**: 80.0 mg (0.1 mmol, 70%); Schmp: 205 °C



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.43 (m, 2 H, H-24), 1.57 (m, 2 H, H-25), 1.85 (m, 2 H, H-23), 1.97 (s, 3 H, H-29), 2.45 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.62 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 2.66 (t, 2 H, H-22), 3.35 (q, 2 H, H-26), 4.24 (dd, 2 H, H-6, H-8), 4.54 (dd, 2 H, H-15, H-17), 5.32 (s, 1 H, H-30i), 5.44 (s(br), OH), 5.71 (s, 1 H, H-30a), 5.89 (t(br), 1 H, NH), 7.24 (m, 4 H, H-2, H-3, H-11, H-12), 7.50 (s, 2 H, H-14, H-18), 7.55 (s, 2 H, H-5, H-9), 7.56 (m, 4 H, H-1, H-4, H-10, H-13)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 18.9 (C-29), 25.0 (C-23), 26.6 (C-24), 29.3 (C-25), 34.2 (C-22), 39.7 (C-26), 46.9 (C-15, C-17), 48.2 (C-6, C-8), 64.9 (C-19, C-20), 119.7 (C-5, C-9, C-30), 120.1 (C-14, C-18), 125.3 (C-3, C-11), 125.4 (C-2, C-12), 127.7 (C-10, C-13), 127.8 (C-1, C-4), 132.2 (2s, C-7, C-16), 133.7 (C-4a, C-9a), 134.9 (C-13a, C-19a), 140.3 (C-6a, C-7a), 142.7 (C-15a, C-16a), 146.4 (C-5a, C-8a), 146.6 (C-14a, C-18a), 168.7 (CONH), 172.0 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3415 cm^{-1} (-OH, -CONH), 3050 (-C=CH₂), 2964, 2933, 2861 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1755 (-C=O), 1655 (-C=C, -C=O, -CONH Amid I), 1614 (Ringschwingung), 1528 (-CONH Amid II), 1484 (Ringschwingung), 1454 (-CH₂, -CH₃), 1278 (-CONH Amid I), 1140 (-COO)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{NO}_4$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

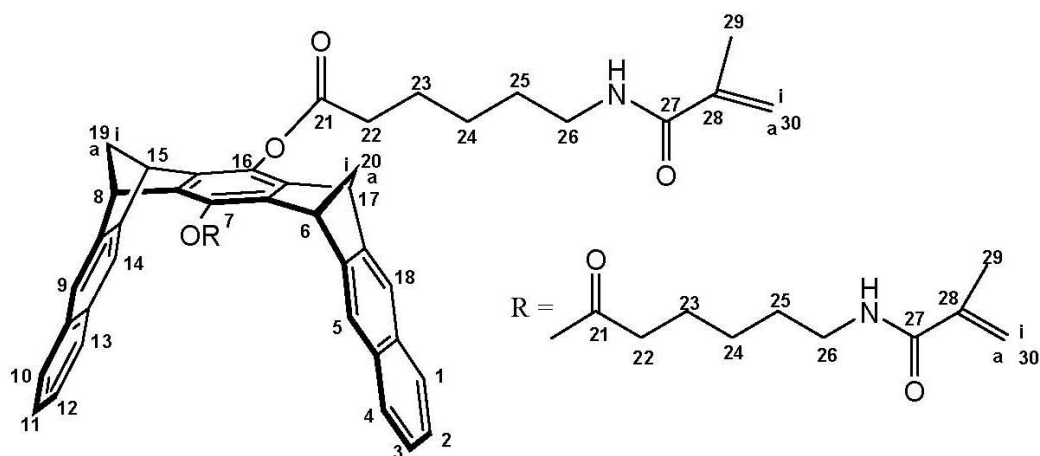
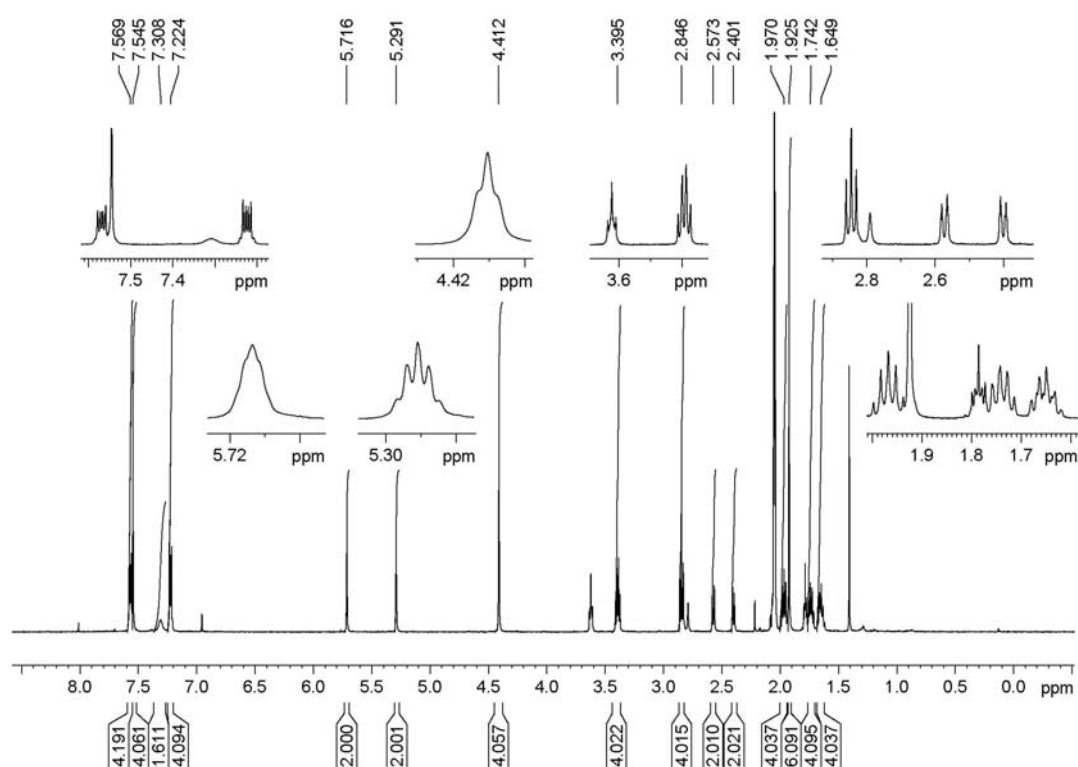
ber. 620.2795

gef. 620.2823

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 642.2615

gef. 642.2640

**5b**

^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 1.65 (m, 4 H, H-24), 1.74 (m, 4 H, H-25), 1.93 (s, 6 H, H-29), 1.97 (m, 4 H, H-23), 2.40 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.57 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 2.85 (t, 4 H, H-22), 3.40 (q, 4 H, H-26), 4.41 (s, 4 H, H-6, H-8, H-15, H-17), 5.29 (s, 2 H, H-30i), 5.72 (s, 2 H, H-30a), 7.22 (m, 4 H, H-2, H-3, H-11, H-12), 7.31 (t(br), 2 H, NH), 7.55 (s, 4 H, H-5, H-9, H-14, H-18), 7.57 (m, 4 H, H-1, H-4, H-10, H-13)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 19.0 (C-29), 25.7 (C-23), 26.1 (C-24), 30.7 (C-25), 34.5 (C-22), 39.9 (C-26), 48.7 (C-6, C-8, C-15, C-17), 65.3 (C-19, C-20), 118.6 (C-30), 120.8 (C-5, C-9, C-14, C-18), 126.0 (C-2, C-3, C-11, C-12), 128.4 (C-1, C-4, C-10, C-13), 133.0 (C-4a, C-9a, C-13a, C-18a), 138.2 (C-7, C-16), 141.8 (C-6a, C-7a, C-15a, C-16a), 147.0 (C-5a, C-8a, C-14a, C-17a), 168.4 (CONH), 171.9 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3433 cm^{-1} (-CONH), 3052 (-C=CH₂), 2938, 2865 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1752 (-C=O), 1660 (-C=C, -C=O, -CONH Amid I), 1621 (Ringschwingung), 1535 (-CONH Amid II), 1455 (-CH₂, -CH₃), 1278 (C-N), 1138 (-COO), 845 (=C-H)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{52}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_6$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 801.3898

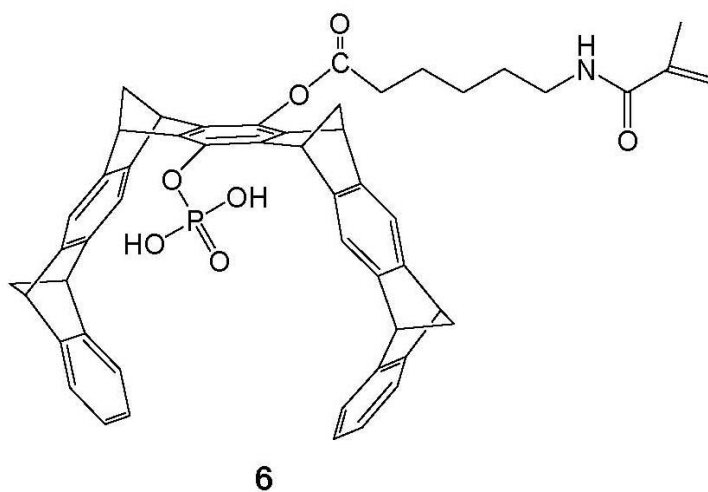
gef. 801.3907

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 823.3718

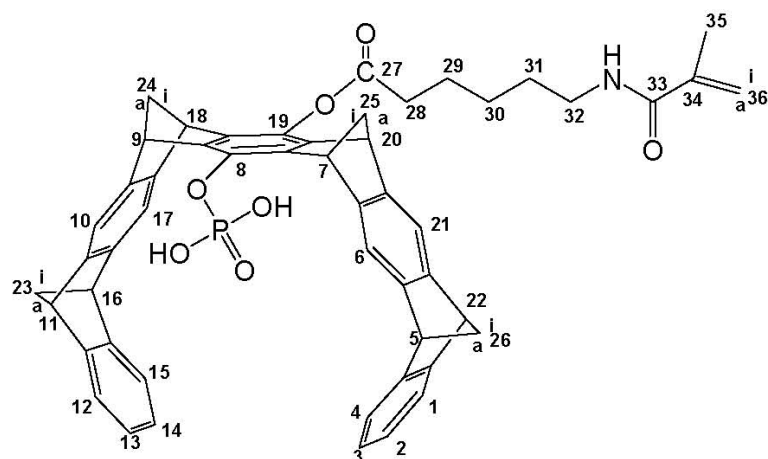
gef. 823.3740

6.5.4 Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Tweezers **4a** zu **6**

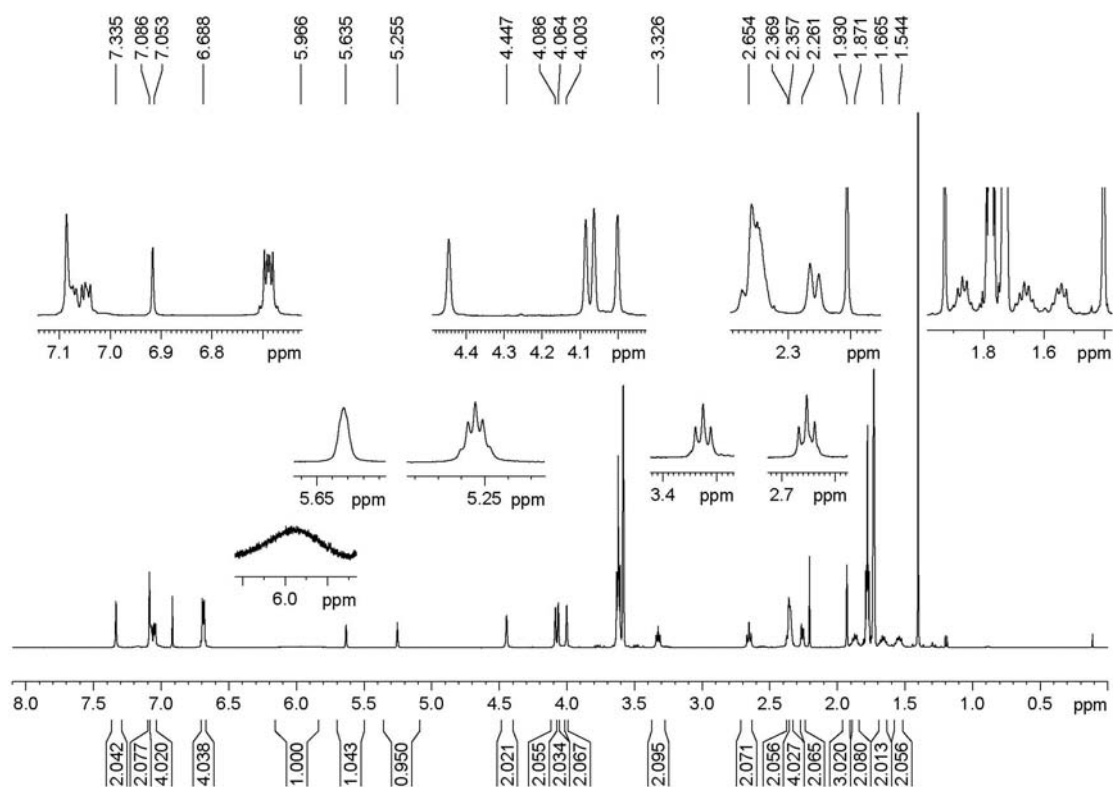


In einem 25 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 40.0 mg (0.05 mmol) **4a** in 20 mL absolutem THF suspendiert. Zu dieser auf 0 °C gekühlten Suspension wurden mittels Einwegspritze 169.3 mg (101 µL, 1.10 mmol) Phosphoroxychlorid gegeben. Nach weiteren 10 Minuten wurden 27.3 mg (37 µL, 0.27 mmol) Triethylamin dazu getropft. Die Suspension wurde 1 h lang bei 0 °C gerührt und anschließend kalt über eine D4-Fritte abfiltriert. Das Filtrat wurde im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingeeengt. Der farblose Rückstand wurde mit wenig dest. Wasser aufgeschlämmt und 10 Minuten lang im US-Bad behandelt. Anschließend wurde der weiße Feststoff über eine D4-Fritte abfiltriert und mehrmals in der Fritte mit dest. Wasser gewaschen. Anschließend wurde dieser mit THF/H₂O (v/v 2:1) in einen Rundkolben überführt und 48 h lang bei RT gerührt. Danach wurde das THF am Rotationsverdampfer abdestilliert, woraufhin ein farbloser Feststoff ausfiel. Dieser wurde erneut im US-Bad behandelt, über eine D4-Fritte abfiltriert und mehrmals mit dest. Wasser gewaschen. Zum Schluss wurde dieser mit THF aus der Fritte gelöst, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **6**: 42.3 mg (0.03 mol, 95%); Schmp: 278 °C (Zersetzung)



6



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 1.54 (m, 2 H, H-30), 1.67 (m, 2 H, H-31), 1.87 (m, 2 H, H-29), 1.93 (s, 3 H, H-35), 2.26 (dd, 2 H, H-24a, H-25a), 2.36 (m, 4 H, H-23a, H-23i, H-26a, H-26i), 2.37 (dd, 2 H, H-24i, H-25i), 2.65 (t, 2 H, H-28), 3.33 (q, 2 H, H-32), 4.00 (t, 2 H, H-7, H-9), 4.06 (t, 2 H, H-5, H-11), 4.09 (t, 2 H, H-16, H-22), 4.45 (t, 2 H, H-18, H-20), 5.26 (s, 1 H, H-36i), 5.64 (s, 1 H, H-36a), 5.97 (br, OH), 6.69 (m, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.05 (m, 4 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.09 (s, 2 H, H-6, H-10), 7.34 (s, 2 H, H-17, H-21)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = 19.1 (C-35), 26.0 (C-29), 27.7 (C-30), 30.6 (C-31), 34.7 (C-28), 40.1 (C-32), 49.8 (C-7, C-9), 49.9 (C-18, C-20), 52.3 (C-5, C-11, C-16, C-22), 69.6 (C-23, C-26), 70.9 (C-24, C-25), 116.9 (C-6, C-10), 117.8 (C-36), 118.9 (C-17, C-21), 122.0 (C-4, C-12), 122.4 (C-1, C-15), 125.2 (C-2, C-3, C-13, C-14), 142.5 (C-18a, C-19a, C-34, C-19), 142.8 (C-7a, C-8a, C-8), 147.4 (C-6a, C-9a, C-20a, C-17a), 148.2 (2s, C-5a, C-10a, C-16a, C-21a), 151.8 (2s, C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 168.2 (CONH), 171.3 (COO)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = -3.29

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3641 cm^{-1} (-OH), 3423, 3352 (-CONH), 3065 (-C=CH₂), 2967, 2863 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1745 (-C=O), 1655 (-C=C, -C=O, -CONH Amid I), 1616 (Ringschwingung), 1540 (-CONH Amid II), 1453 (Ringschwingung), 1275 (-P=O, -CONH Amid I), 1214 (P-O-Aryl), 1159 (-P=O)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{52}\text{H}_{46}\text{NO}_7\text{P}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 828.3085

gef. 828.3079

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 850.2904

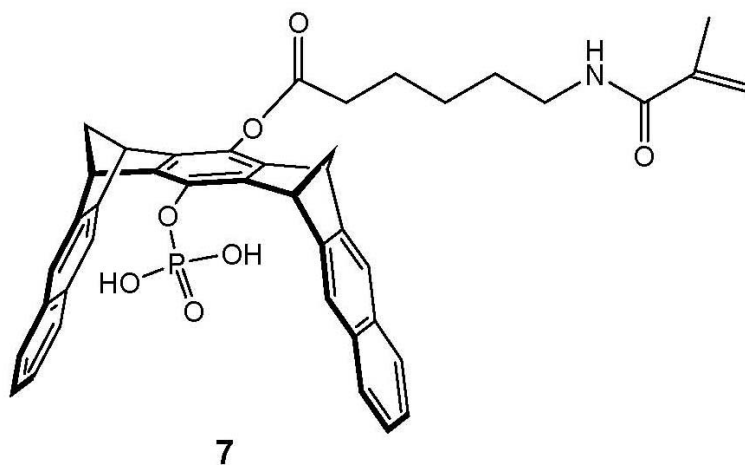
gef. 850.2902

m/z $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$:

ber. 872.2724

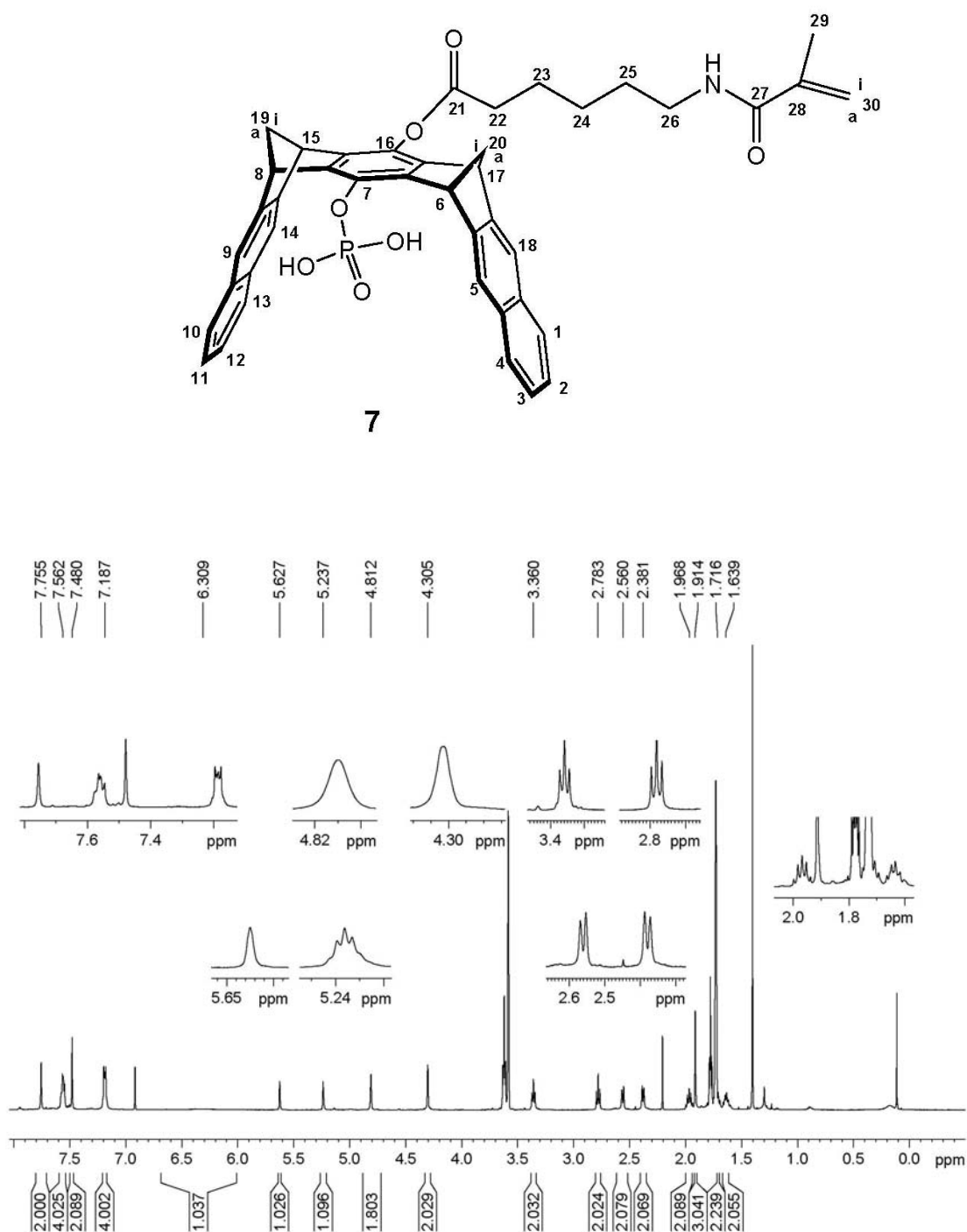
gef. 850.2714

6.5.5 Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Clips 5a zu 7



In einem 25 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 42.0 mg (0.07 mmol) der Verbindung **5a** in 20 mL absolutem THF suspendiert und bei 0 °C mit 145.0 mg (86 µL, 0.96 mmol) Phosphoroxychlorid versetzt. Nach 10 Minuten wurden 34.5 mg (47 µL, 0.34 mmol) Triethylamin dazu getropft. Die Suspension wurde 1 h lang bei 0 °C gerührt und anschließend kalt über eine D4-Fritte abfiltriert. Die Aufarbeitung erfolgte analog 6.4.4.

Ausbeute an **7**: 46.2 mg (0.07 mol, 98%); Schmp: 237 °C (Zersetzung)



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 1.64 (m, 2 H, H-24), 1.72 (m, 2 H, H-25), 1.91 (s, 3 H, H-29), 1.97 (m, 2 H, H-23), 2.38 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.56 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 2.78 (t, 2 H, H-22), 3.36 (q, 2 H, H-26), 4.31 (dd, 2 H, H-6, H-8), 4.81 (dd, 2 H, H-15, H-17), 5.24 (s, 1 H, H-30i), 5.63 (s, 1 H, H-30a), 6.31 (t(br), NH), 7.19 (m, 4 H, H-2, H-3, H-11, H-12), 7.48 (s, 2 H, H-5, H-9), 7.56 (m, 4 H, H-1, H-4, H-10, H-13), 7.76 (s, 2 H, H-14, H-18)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = 19.1 (C-29), 26.0 (C-23), 27.7 (C-24), 30.7 (C-25), 34.6 (C-22), 40.1 (C-26), 49.1 (C-15, C-17), 49.2 (C-6, C-8), 65.9 (C-19, C-20), 117.8 (C-30), 120.4 (C-5, C-9), 122.3 (C-14, C-18), 125.7 (C-2, C-3, C-11, C-12), 128.3 (C-1, C-4, C-10, C-13), 128.5 (2s, C-a, C-a), 133.3 (2s, C-4a, C-9a, C-13a, C-18a), 141.9 (C-15a, C-16a, C-16), 142.2 (C-6a, C-7a, C-7), 142.5 (C-28), 147.3 (C-14a, C-17a), 147.6 (C-5a, C-8a), 168.3 (CONH), 171.6 (COO)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = -3.46

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3641 cm^{-1} (-OH), 3414, 3335 (-CONH), 3056 (-C=CH₂), 2955, 2866 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1758 (-C=O), 1655 (-C=C, -C=O, -CONH Amid I), 1611 (Ringschwingung), 1534 (-CONH Amid II), 1431 (Ringschwingung), 1278 (-P=O, -CONH Amid I), 1231 (P-O-Aryl), 1149 (-P=O)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{NO}_7\text{P}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 700.2459

gef. 700.2461

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 722.2278

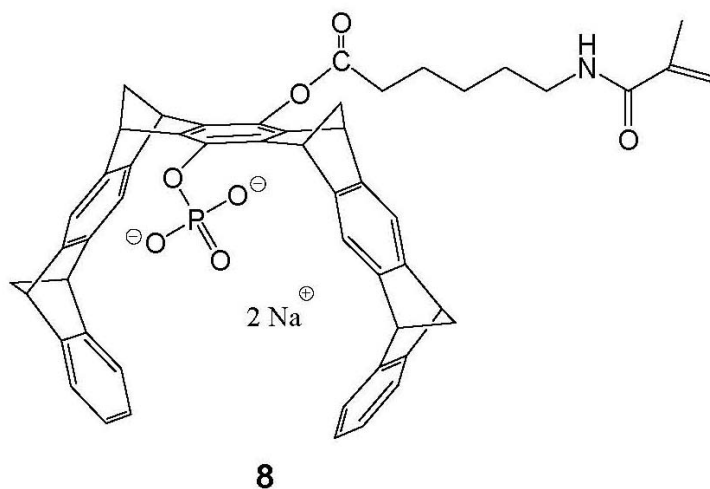
gef. 722.2276

m/z $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$:

ber. 744.2132

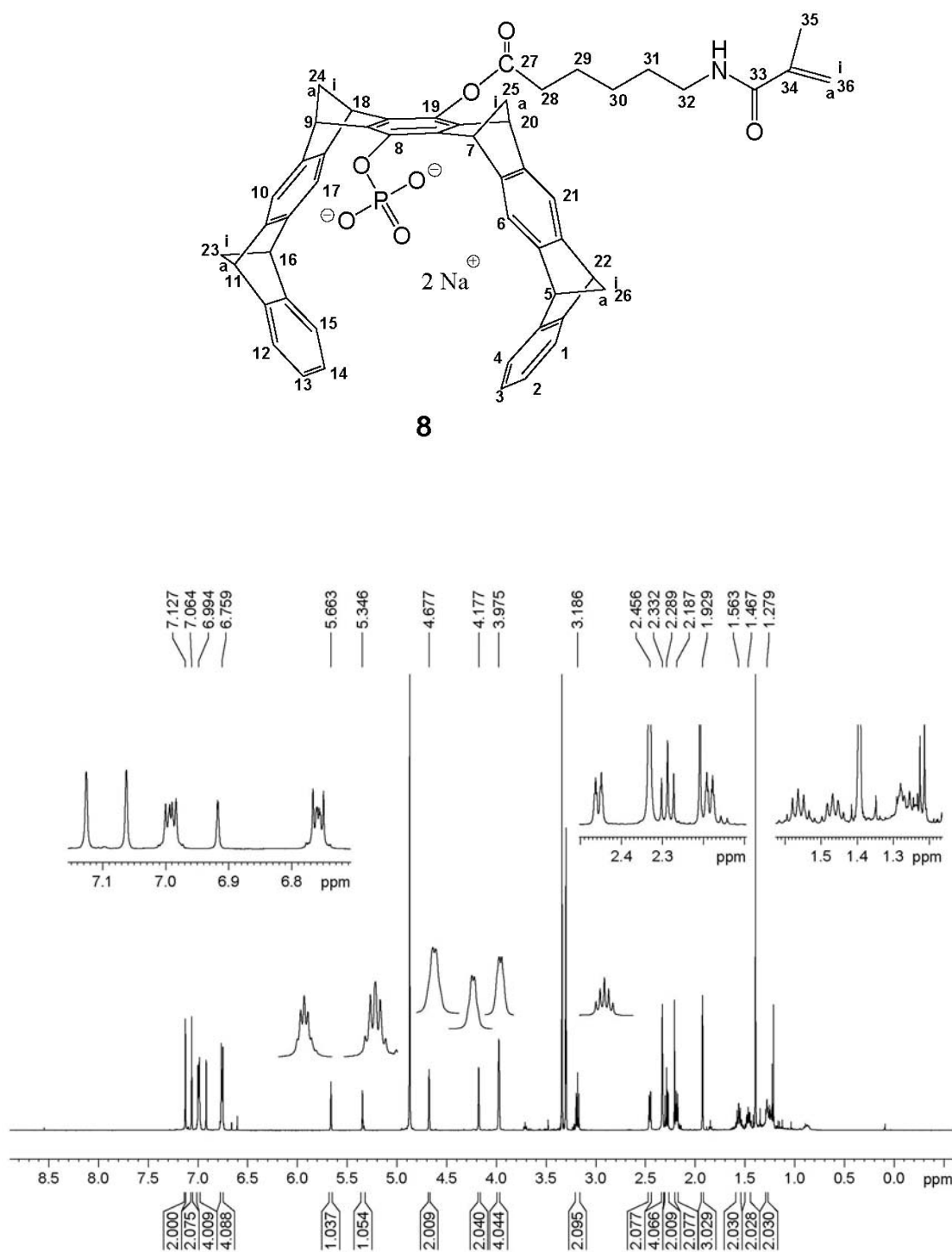
gef. 744.2098

6.5.6 Synthese des Bis-Natriumsalzes **8**



In einem 10 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 17.4 mg (0.02 mmol) der Verbindung **6** in 5 mL Methanol p.a. gelöst und bei RT mit 2.5 mg (0.04 mmol) Natriumhydroxid-Monohydrat versetzt. Man ließ die Reaktionsmischung 1 h lang bei RT rühren und entfernte anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Der beige Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **8**: 18.3 mg (0.02 mol, quantitativ); Schmp: 237 °C (Zersetzung)



¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1.28 (m, 2 H, H-30), 1.47 (m, 2 H, H-31), 1.56 (m, 2 H, H-29), 1.93 (s, 3 H, H-35), 2.19 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.29 (t, 2 H, H-28), 2.33 (m, 4 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a), 2.46 (dt, 2 H, H-24i, H-25i), 3.19 (q, 2 H, H-32), 3.98 (t, 4 H, H-5, H-11, H-16, H-22), 4.18 (t, 2 H, H-7, H-9), 4.68 (t, 2 H, H-18, H-20), 5.35 (s, 1 H, H-36a), 5.66 (s, 1 H, H-36i), 6.76 (m, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 6.99 (m, 4 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.06 (s, 2 H, H-6, H-10), 7.13 (s, 2 H, H-17, H-21)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 18.9 (C-35), 25.7 (C-29), 25.8 (C-31), 27.6 (C-30), 34.8 (C-28), 40.6 (C-32), 48.6 (C-7, C-9), 49.9 (C-18, C-20), 52.6 (C-5, C-11, C-16, C-22), 69.1 (C-23, C-26), 69.4 (C-24, C-25), 116.6 (C-6, C-10), 117.4 (C-17, C-21), 120.3 (C-36), 122.1 (C-1, C-4, C-12, C-15), 126.0 (C-3, C-13), 126.0 (C-2, C-14), 136.8 (C-18a, C-19a, C-19), 141.7 (C-34), 143.0 (C-7a, C-8a, C-8), 148.3 (C-5a, C-10a), 148.4 (C-16a, C-21a), 150.1 (C-17a, C-20a), 150.4 (C-6a, C-9a), 152.3 (2s, C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 171.5 (CONH), 175.9 (COO)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 2.43

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3419 cm^{-1} (-CONH), 3065 (-C=CH₂), 2960, 2863 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1656 (-C=C, -C=O, -CONH Amid I), 1621 (Ringschwingung), 1557 (-CONH Amid II), 1455 (Ringschwingung), 1310 (-P=O), 1278 (-CONH Amid I), 1233 (P-O-Aryl), 1098 (Phosphat), 835 (=C-H)

UV/Vis (CH_3OH): λ_{max} [nm] ($\lg \varepsilon$) = 214 (4.13), 238 (4.06), 283 (3.93)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{52}\text{H}_{44}\text{NNa}_2\text{O}_7\text{P}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 872.2724

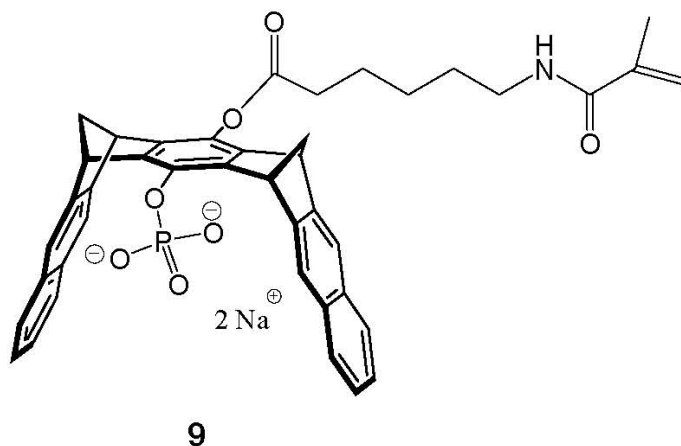
gef. Nicht ESI aktiv

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 894.2543

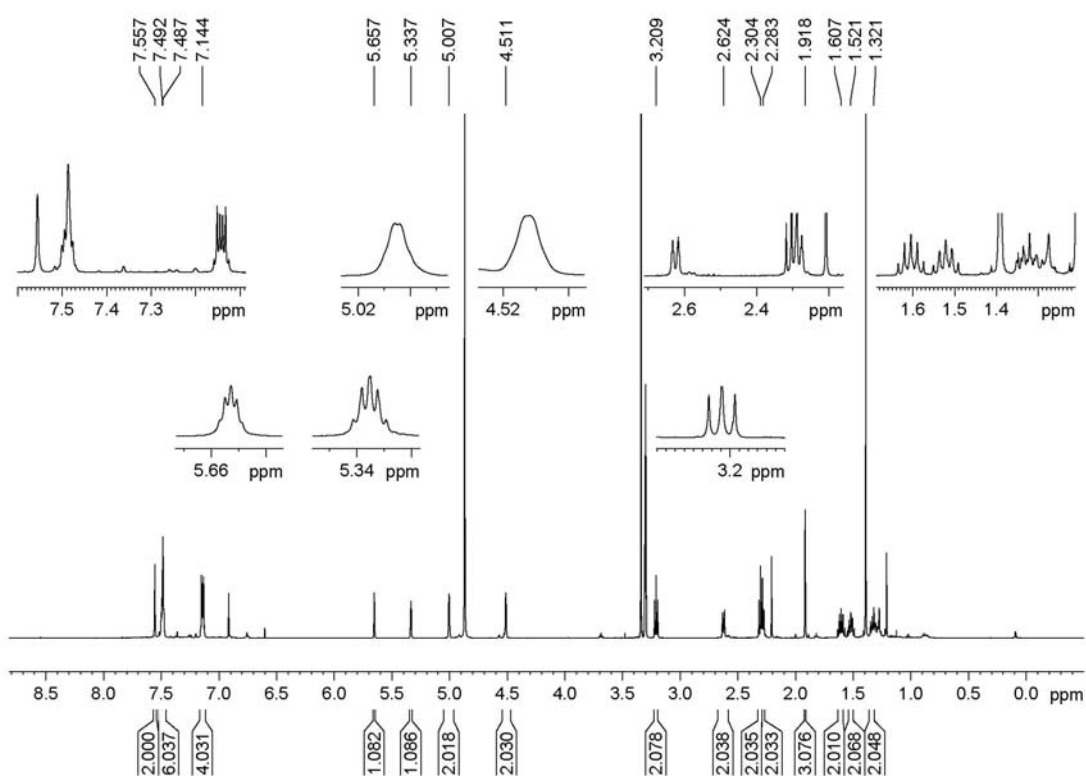
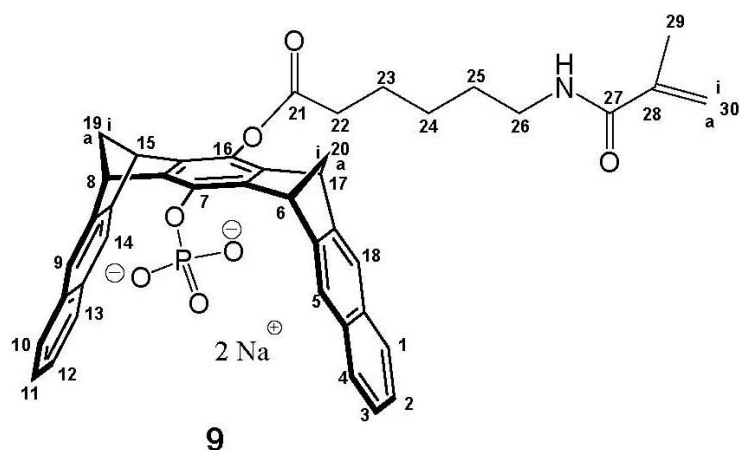
gef. Nicht ESI aktiv

6.5.7 Synthese des Bis-Natriumsalzes **9**



In einem 10 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 15.5 mg (0.02 mmol) Monophosphat-Clip **6** in 5 mL Methanol p.a. gelöst. Zu dieser Lösung wurden bei RT 2.6 mg (0.04 mmol) Natriumhydroxid-Monohydrat gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h lang bei RT gerührt und anschließend vom Lösungsmittel befreit. Der beige Rückstand wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **9**: 16.5 mg (0.02 mol, quantitativ); Schmp: 221 °C



¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1.32 (m, 2 H, H-24), 1.52 (m, 2 H, H-25), 1.61 (m, 2 H, H-23), 1.92 (s, 3 H, H-29), 2.28 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.30 (t, 2 H, H-22), 2.62 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 3.21 (q, 2 H, H-26), 4.51 (dd, 2 H, H-6, H-17), 5.01 (dd, 2 H, H-8, H-15), 5.34 (s, 1 H, H-30i), 5.66 (s, 1 H, H-30a), 7.14 (m, 4 H, H-2, H-3, H-11, H-12), 7.49 (s, 2 H, H-9, H-14), 7.49 (m, 4 H, H-1, H-4, H-10, H-13), 7.56 (s, 1 H, H-5, H-18)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 18.8 (C-29), 25.7 (C-23), 27.5 (C-24), 30.1 (C-25), 34.7 (C-22), 40.4 (C-26), 48.2 (C-6, C17), 49.4 (C-8, C-15), 65.1 (C-19, C-20), 119.5 (C-1, C-4, C-10, C-13), 120.1 (C-30), 120.3 (C-5, C-18), 125.5 (C-2, C-3, C-11, C-12), 128.4 (C-1, C-4, C-10, C-13), 133.5 (C-4a, C-9a, C-13a, C-18a), 136.0 (C-7, C-16), 141.5 (C-28), 141.7 (C-5a, C-8a, C-14a, C-17a), 150.3 (C-8a, C-14a), 150.4 (C-5a, C-17a), 171.3 (CONH), 175.9 (COO)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 2.39

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3419 cm^{-1} (-CONH), 3057 (-C=CH₂), 2954, 2867 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1716 (-C=O), 1656 (-C=C, -C=O, -CONH Amid I), 1615 (Ringschwingung), 1532 (-CONH Amid II), 1456 (Ringschwingung), 1315 (-P=O), 1282 (-CONH Amid I), 1102 (Phosphat), 835 (=C-H)

UV/Vis (CH_3OH): λ_{max} [nm] ($\lg \varepsilon$) = 220 (4.22), 260 (3.79), 320 (3.54)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{NNa}_2\text{O}_7\text{P}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 744.2098

gef. Nicht ESI aktiv

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

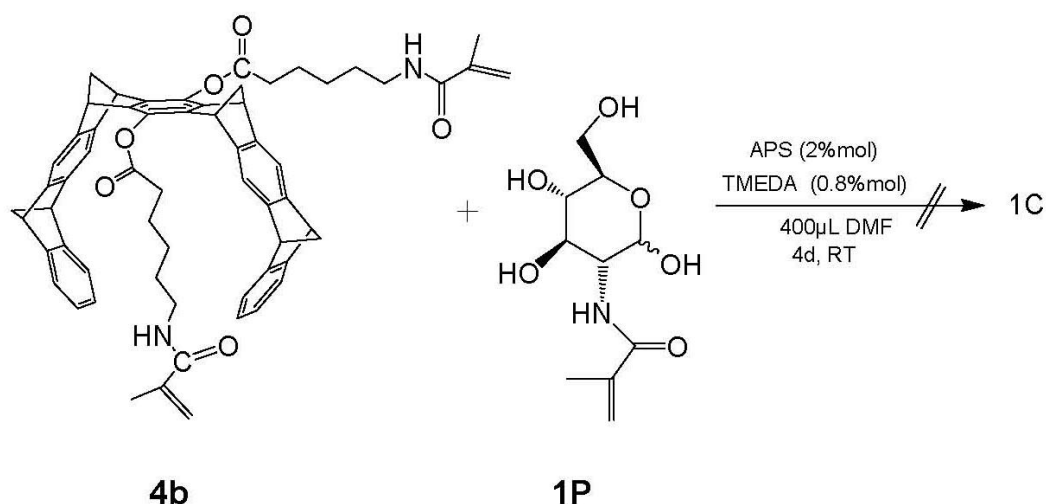
ber. 766.1917

gef. Nicht ESI aktiv

6.5.8 Polymerisationsversuche

6.5.8.1 Erster Versuch

Copolymerisation von 4b mit dem Monomer 1P

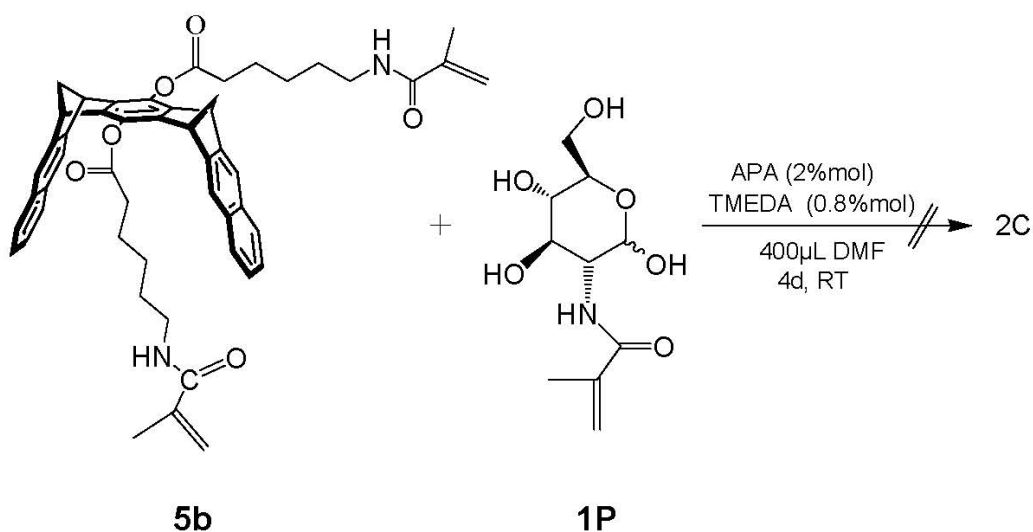


Die Copolymerisation des Crosslinkers **4b** mit Glucoseacrylamid **1P** wurde in einer 96-Loch-Mikroplatte unter Schutzgasatmosphäre an der Universität Dortmund durchgeführt. Dazu wurden die beiden Monomere **4b** und **1P** im Mol-Verhältnis 1:10 in 400 µL absolutem DMF gelöst. Anschließend wurde diese Lösung mit 2.0 %mol Ammoniumpersulfat (APS) und 0.8 %mol *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TMEDA) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde etwa vier Tage lang bei RT stehen gelassen, bevor es zur Isolierung des Copolymers kam. Dazu wurden in einem 25 mL-Einhalsskolben 8 mL Ethylacetat vorgelegt, zu der unter Rühren langsam das Reaktionsgemisch zugetropft wurde. Dabei fiel sofort ein weißer Feststoff aus, der über eine D4-Fritte abfiltriert und mit wenig Ethylacetat gewaschen wurde. Anschließend wurde dieser mit Methanol aus der Fritte gelöst. Durch Abdestillieren des Lösungsmittels konnten 28 mg an weißem Feststoff isoliert werden.

Monomer 4b		Monomer 1P		APS		TMEDA	
[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]
12.0	0.013	32.0	0.13	0.65	0.003	0.13	0.001

Die Durchführung der Copolymere **2C** – **4C** erfolgte analog.

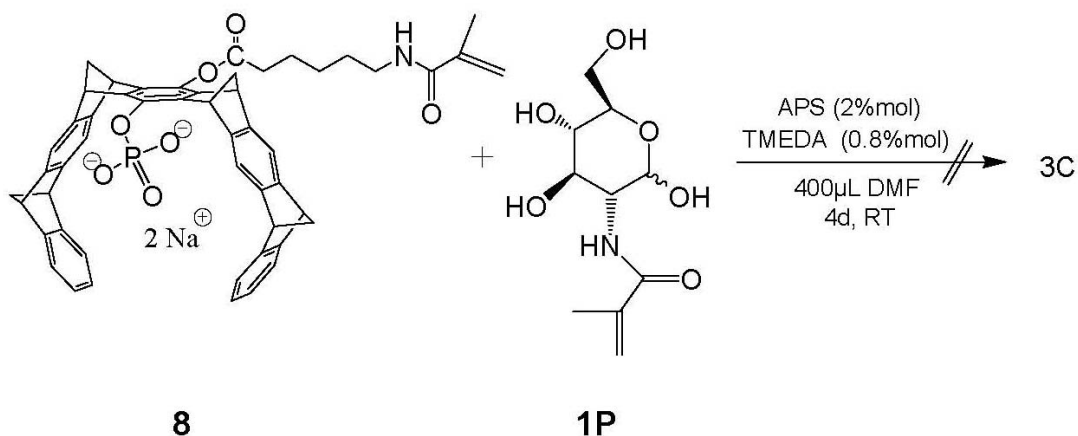
Copolymerisation von 5b mit dem Monomer 1P



Monomer 5b		Monomer 1P		APS		TMEDA	
[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]
12.0	0.015	37.1	0.15	0.76	0.033	0.154	0.0013

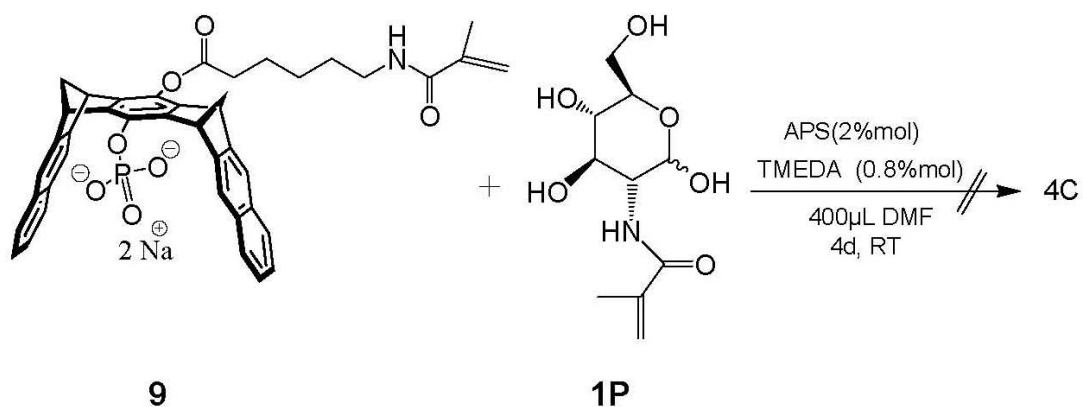
Es wurden 25.0 mg an weißem Feststoff erhalten.

Copolymerisation von 8 mit dem Monomer 1P



Monomer 8		Monomer 1P		APS		TMEDA	
[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]
12	0.014	34.1	0.14	0.70	0.003	0.141	0.0012

Es wurden 33.0 mg an weißem Feststoff erhalten.

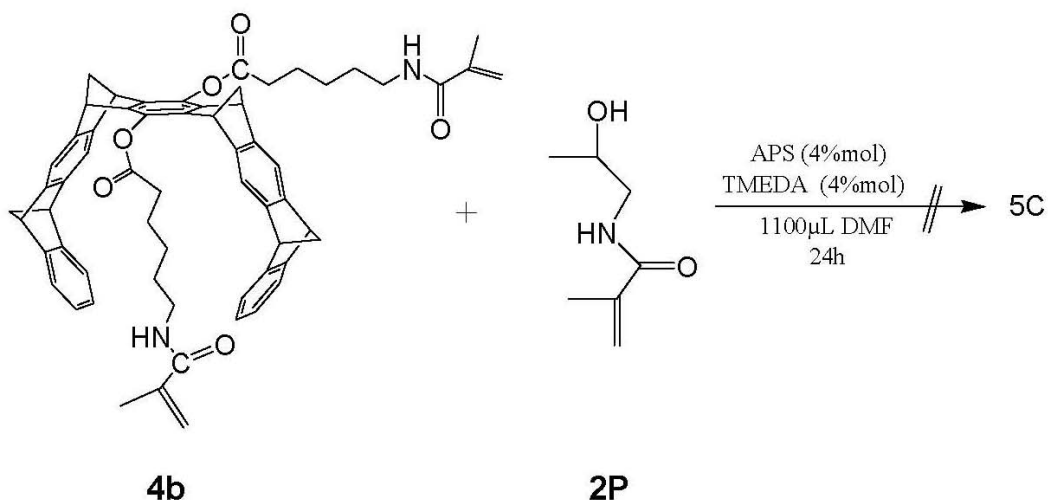
Copolymerisation von 9 mit dem Monomer 1P

Monomer 9		Monomer 1P		APS		TMEDA	
[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]
12.0	0.016	40.0	0.16	0.81	0.004	0.165	0.0014

Es wurden 30.0 mg an weißem Feststoff erhalten.

6.5.8.2 Zweiter Versuch

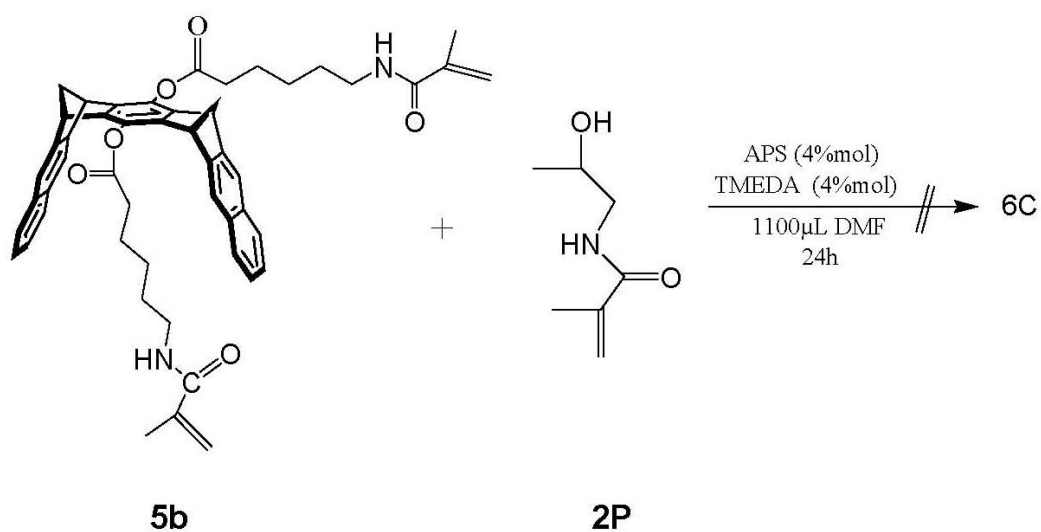
Copolymerisation von 4b mit dem Monomer 2P



Die Copolymerisation des Crosslinkers **4b** mit dem Aminoalkohol **2P** wurde in einem kleinen Glasgefäß unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Dazu wurden beide Monomere **4b** und **2P** im Mol-Verhältnis 1:10 in 1 mL absolutem DMF gelöst. Parallel dazu wurden in einem anderen Glasgefäß 7.3 mg (0.032 mmol, 4 %mol) Ammoniumpersulfat (APS) in 100 μL DMF gelöst. Beide Lösungen wurden 10 Minuten lang mit Argon gespült. Anschließend wurde die Monomer-Lösung mit der Ammoniumpersulfat-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 3.7 mg (0.032 mmol, 5 μL , 4 %mol) *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TMEDA) wurde die Reaktionsmischung 24 h lang bei RT gerührt. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel abkondensiert. Es konnten 34.0 mg an weißem Feststoff isoliert werden.

Monomer 4b		Monomer 2P		APS		TMEDA	
[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]
64.0	0.08	103.0	0.7	7.3	0.03	3.7	0.03

Die Durchführung des Copolymers **6C** erfolgte analog.

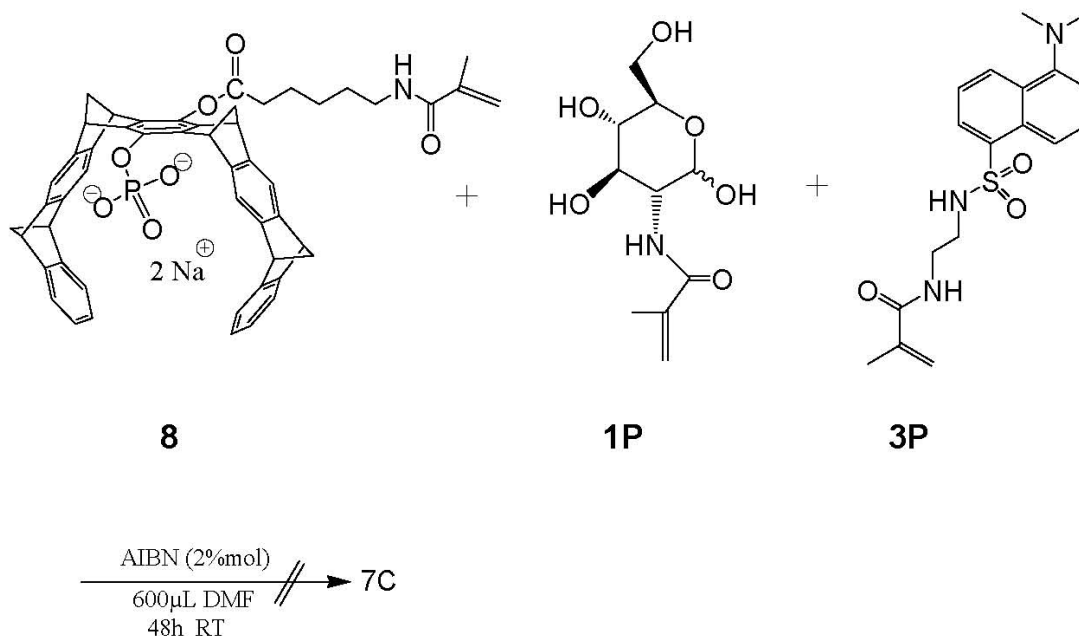
Copolymerisation von 5b mit dem Monomer 2P

Monomer 5b		Monomer 2P		APS		TMEDA	
[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]	[mg]	[mmol]
74.0	0.08	103.0	0.7	7.3	0.03	3.7	0.03

Es wurden 28.0 mg an weißem Feststoff erhalten.

6.5.8.3 Dritter Versuch

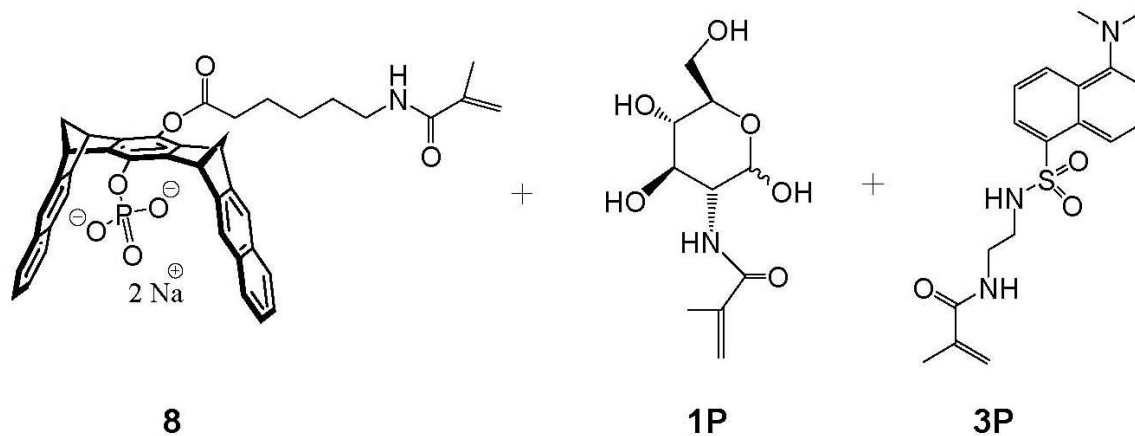
Copolymerisation von 8 mit den beiden Monomeren 1P und 3P



Die Copolymerisation des Monomers **8** mit den beiden Monomeren Glucoseacrylamid **1P** und Dansylacrylamid **3P** wurde in einem von K. Wenck für Polymerisationen speziell angefertigten Glasgefäß durchgeführt. Zunächst wurde von allen drei Monomeren jeweils eine 0.3 M Stammlösung in DMF angesetzt, die anschließend miteinander vereinigt wurden. Durch Zugabe von 15 µL AIBN (100 mg/mL, 0.61 mol) wurde die Reaktion gestartet. Die Reaktionsmischung wurde 72 h lang bei 60 °C im Thermomixer gerührt. Zum Schluss wurde das Lösungsmittel an der Lyophille entfernt. Das Rohprodukt wurde in wenig Ethylacetat aufgenommen und 30 Minuten lang im US-Bad behandelt. Nachdem der Feststoff abfiltriert wurde, wurde der Rückstand nacheinander mit 10 mL Methanol, 10 mL THF und 10 mL Dichlormethan gewaschen.

Monomer 8		Monomer 1P		Monomer 3P		AIBN	
[mg]	[mol]	[mg]	[mol]	[mg]	[mol]	[mg]	[mol]
58.5	0.3	100	0.3	100	0.3	100	0.6

Die Durchführung des Copolymers **8C** erfolgte analog.

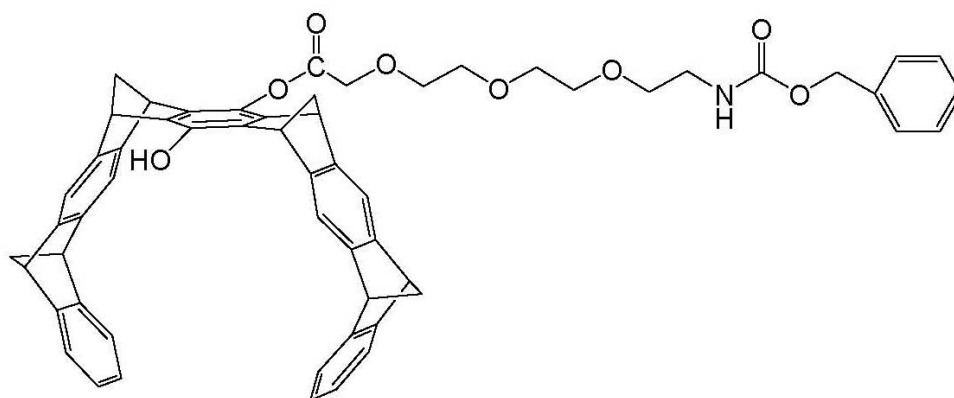
Copolymerisation von 9 mit den beiden Monomeren 1P und 3P

Monomer 9		Monomer 1P		Monomer 3P		AIBN	
[mg]	[mol]	[mg]	[mol]	[mg]	[mol]	[mg]	[mol]
58.5	0.32	100	0.32	100.0	0.32	100.0	0.61

6.6 Synthese Fluoreszenzmarkierter Tweezer und Clips

6.6.1 Erste Syntheseroute

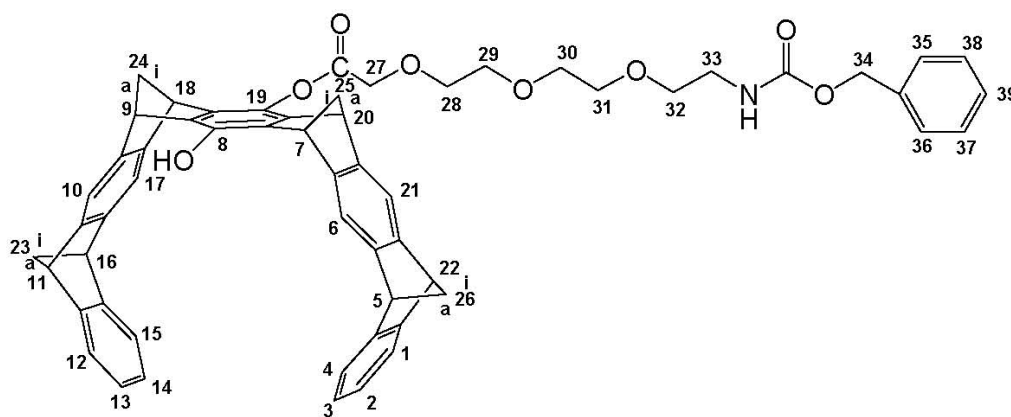
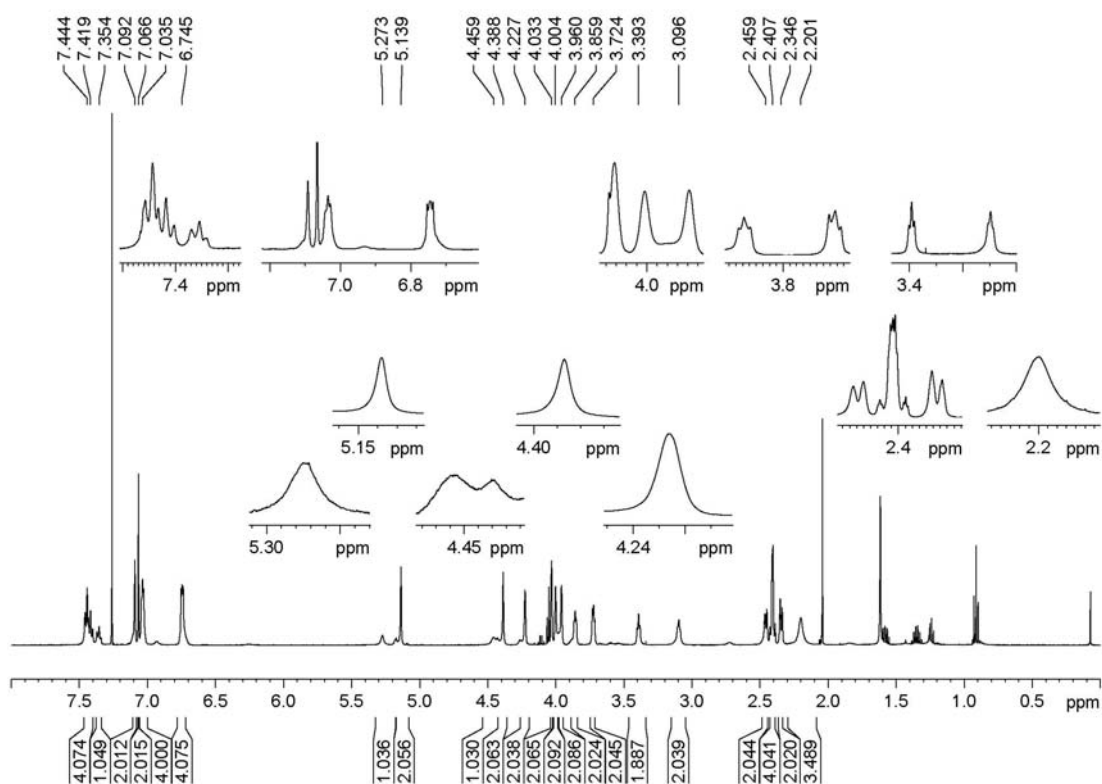
6.6.1.1 Veresterung des Z-geschützten TEG-Linkers 4L mit dem Bis-Hydroxy-Tweezer 29S unter Bildung des monosubstituierten Hydroxy-Tweezers 11a



11a

In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 125.0 mg (0.37 mmol) Z-geschützter TEG-Linker **4L** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Nach erfolgter Zugabe von 190.0 mg (0.37 mmol) PyBOP und 112.0 mg (122 μ L, 1.11 mmol) *N*-Methylmorpholin bei RT wurde die klare Lösung auf 40 °C erwärmt. Parallel dazu wurden in einem 100 mL-Stickstoffkolben unter Argon 220.0 mg (0.39 mmol) Bis-Hydroxy-Tweezer **29S** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und ebenfalls auf 40 °C erhitzt. Zu dieser Lösung wurde dann langsam das erste Reaktionsgemisch getropft. Die gelbe Reaktionsmischung wurde 48 h lang bei 40 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan (v/v 1:1) gereinigt. Man erhielt das monosubstituierte Produkt **11a** (R_F = 0.35) als farblosen kristallinen Feststoff.

Ausbeute an **11a**: 169 mg (0.19 mmol, 49%); Schmp: 157 °C

**11a**

^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 2.20 (t(br), 4 H, H-32, H-33), 2.35 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.41 (m, 4 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a), 2.46 (dt, 2 H, H-24i, H-25i), 3.10 (t, 2 H, H-30), 3.39 (t, 2 H, H-31), 3.72 (t, 2 H, H-28), 3.86 (t, 2 H, H-29), 3.96 (t, 2 H, H-7, H-9), 4.00 (t, 2 H, H-5, H-11), 4.03 (t, 2 H, H-16, H-22), 4.23 (t, 2 H, H-18, H-20), 4.39 (s, 2 H, H-27), 4.46 (s(br), 1 H, NH), 5.14 (s, 2 H, H-34), 5.27 (s(br), 1 H, OH), 6.75 (dd, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.03 (d, 4 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.07 (s, 2 H, H-6, H-10), 7.09 (s, 2 H, H-17, H-21), 7.35 (m, 1 H, H-39), 7.42, 7.44 (m, 4 H, H-35, H-36, H-37, H-38)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 40.0 (C-32), 47.5 (C-18, C-20), 48.9 (C-7, C-9), 51.3 (C-5, C-11, C-16, C-22), 66.9 (C-34), 68.7 (C-33), 68.8 (C-27), 68.9 (C-23, C-26), 69.7 (C-30), 69.9 (C-24, C-25), 70.0 (C-31), 70.5 (C-28); 71.1 (C-29), 116.5 (C-6, C-10), 116.8 (C-17, C-21), 121.5, 121.7 (C-1, C-4, C-12, C-15), 124.6, 124.8 (C-2, C-3, C-13, C-14), 128.4, 128.5 (C-35, C-36, C-37, C-38), 128.8 (C-39), 136.8 (C-34a); 137.3 (C-7a, C-8a, C-8); 140.7 (C-18a, C-19a, C-19), 146.7 (C-17a, C-20a), 147.1 (C-6a, C-9a), 147.5 (C-5a, C-10a), 147.6 (C-16a, C-21a); 150.7 (C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 156.4 (CONH); 169.2 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3410 cm^{-1} (-OH, -CONH), 2969, 2934, 2863 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1773 (-C=O), 1720, 1699, 1655 (-C=O, -CONH Amid I), 1587 (Ringschwingung), 1519 (-CONH Amid II), 1454 (-CH₂, -CH₃), 1275 (-CONH Amid I), 1122 (-COC), 837 (=C-H)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{58}\text{H}_{52}\text{NO}_8$

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 912.3530

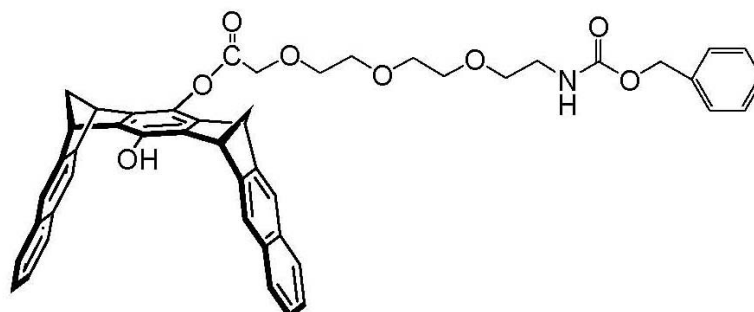
gef. 912.3507

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$:

ber. 888.3572

gef. 888.3542

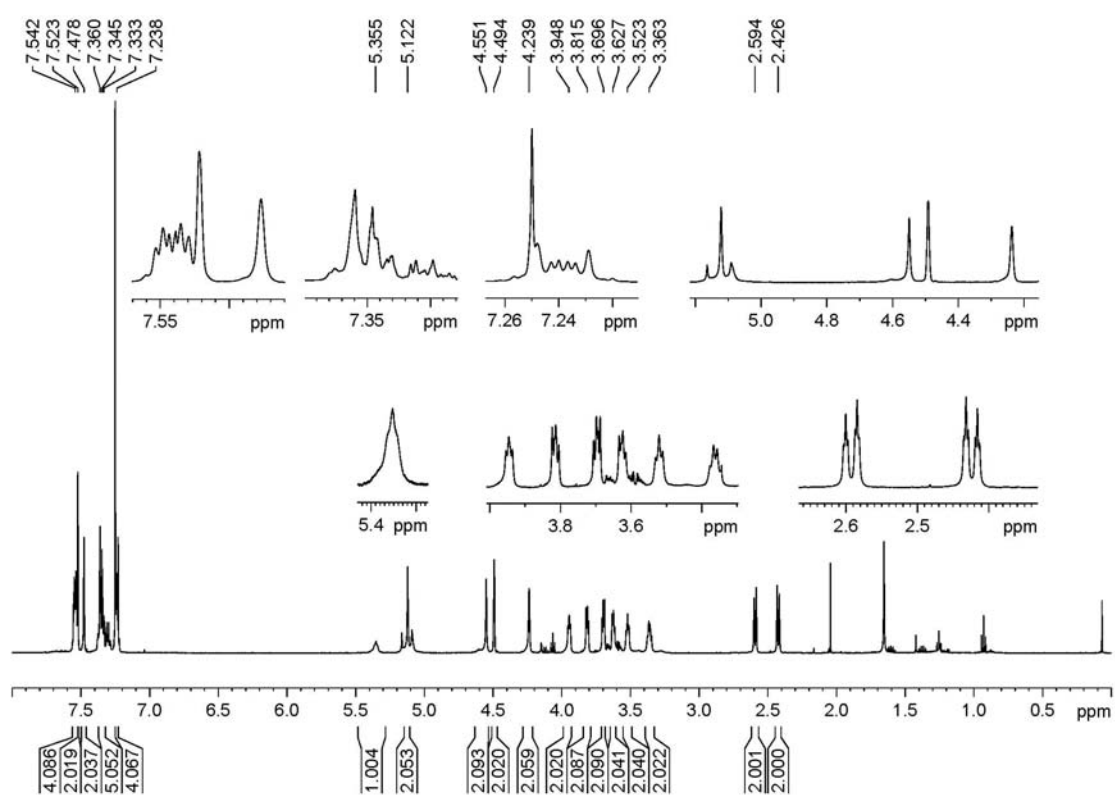
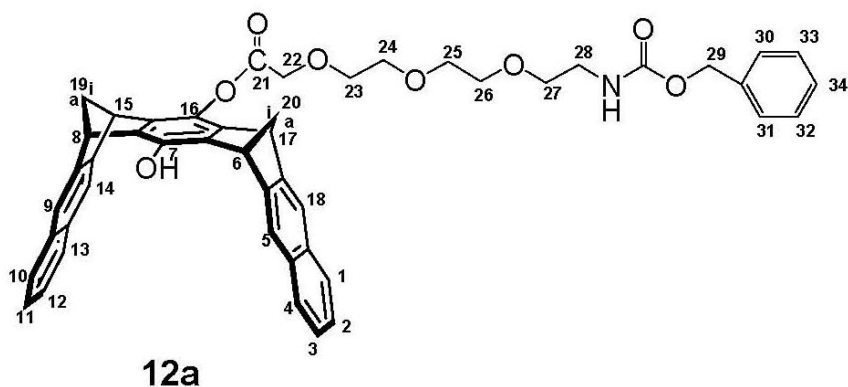
6.6.1.2 Veresterung des Z-geschützten TEG-Linkers 4L mit dem Bis-Hydroxy-Clip 13S unter Bildung des monosubstituierten Hydroxy-Clips 12a



12a

In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 215.0 mg (0.63 mmol) Z-geschützter TEG-Linker **4L** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurden bei RT 360.0 mg (0.69 mmol) PyBOP und nach weiteren 15 Minuten 125.0 mg (234 μ L, 2.13 mmol) *N*-Methylmorpholin gegeben. Die klare Lösung wurde auf 40 °C erwärmt. Parallel dazu wurden in einem 100 mL-Stickstoffkolben ebenfalls unter Schutzgas 300.0 mg (0.69 mmol) Bis-Hydroxy-Clip **13S** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und ebenfalls auf 40 °C erhitzt. Diese Lösung wurde langsam mit dem ersten Reaktionsgemisch, versetzt. Die braune Reaktionsmischung wurde 48 h lang bei 40 °C gerührt. Nachdem das Lösungsmittel abdestilliert wurde, erfolgte die säulenchromatographisch Reinigung des Rohprodukts über Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan (v/v 1:1). Das monosubstituierte Produkt **12a** (R_F = 0.42) konnte als brauner kristalliner Feststoff isoliert werden.

Ausbeute an **12a**: 175 mg (0.23 mmol, 34%); Schmp: 77 °C



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 2.43 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.59 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 3.36 (t, 2 H, H-28), 3.52 (t, 2 H, H-27), 3.63 (t, 2 H, H-25), 3.70 (t, 2 H, H-26), 3.82 (t, 2 H, H-23), 3.95 (t, 2 H, H-24), 4.24 (dd, 2 H, H-6, H-8), 4.49 (dd, 2 H, H-15, H-17), 4.55 (s, 2 H, H-22), 5.12 (s, 2 H, H-29), 5.36 (t(br), 1 H, NH), 7.24 (m, 4 H, H-2, H-3, H-11, H-12), 7.33, 7.35, 7.36 (m, 5 H, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34), 7.48 (s, 2 H, H-14, H-18), 7.52 (s, 2 H, H-5, H-9), 7.54 (m, 4 H, H-1, H-4, H-10, H-13)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 40.9 (C-28), 46.7 (C-15, C-17), 48.1 (C-6, C-8), 64.8 (C-19, C-20), 66.8 (C-29), 68.6 (C-22), 70.0 (C-27), 70.3 (C-25), 70.6 (C-26), 70.7 (C-23); 71.2 (C-24), 119.6 (C-5, C-9), 120.1 (C-14, C-18), 125.3 (C-2, C-3, C-11, C-12), 127.6, 127.7 (C-1, C-4, C-10, C-13), 128.2, 128.6 (C-30, C-31, C-32, C-33, C-34), 132.1 (C-4a, C-9a, C-13a, C-18a), 133.0 (C-7), 134.9 (C-16), 136.6 (C-29a), 140.2 (C-6a, C-7a), 142.7 (C-15a, C-16a), 146.1 (C-5a, C-8a), 146.3 (C-14a, C-17a), 156.6 (CONH), 168.8 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3346 cm^{-1} (-OH, -CONH), 2961, 2933, 2866 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1773 (-C=O), 1697 (-C=O, -CONH Amid I), 1587 (Ringschwingung), 1522 (-CONH Amid II), 1481, 1454 (-CH₂, -CH₃), 1278 (-CONH Amid I), 1125 (-COC), 836 (=C-H)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{48}\text{H}_{43}\text{NO}_8$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 762.3061

gef. 762.3092

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 784.2881

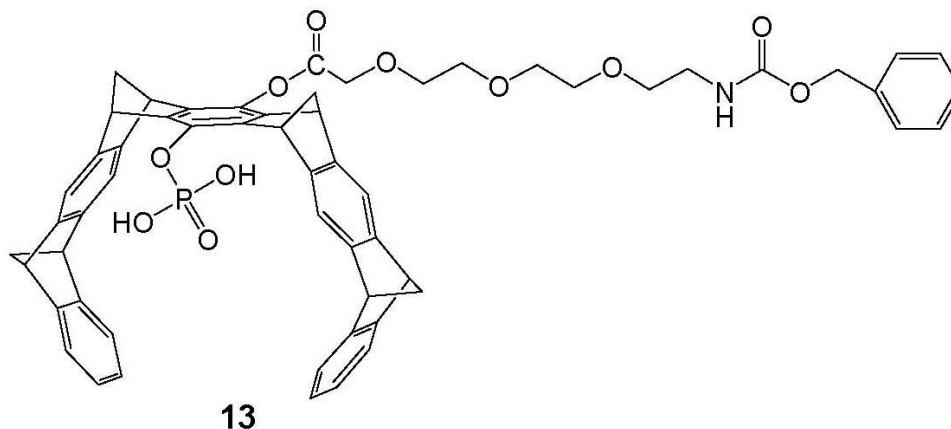
gef. 784.2945

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$:

ber. 760.2916

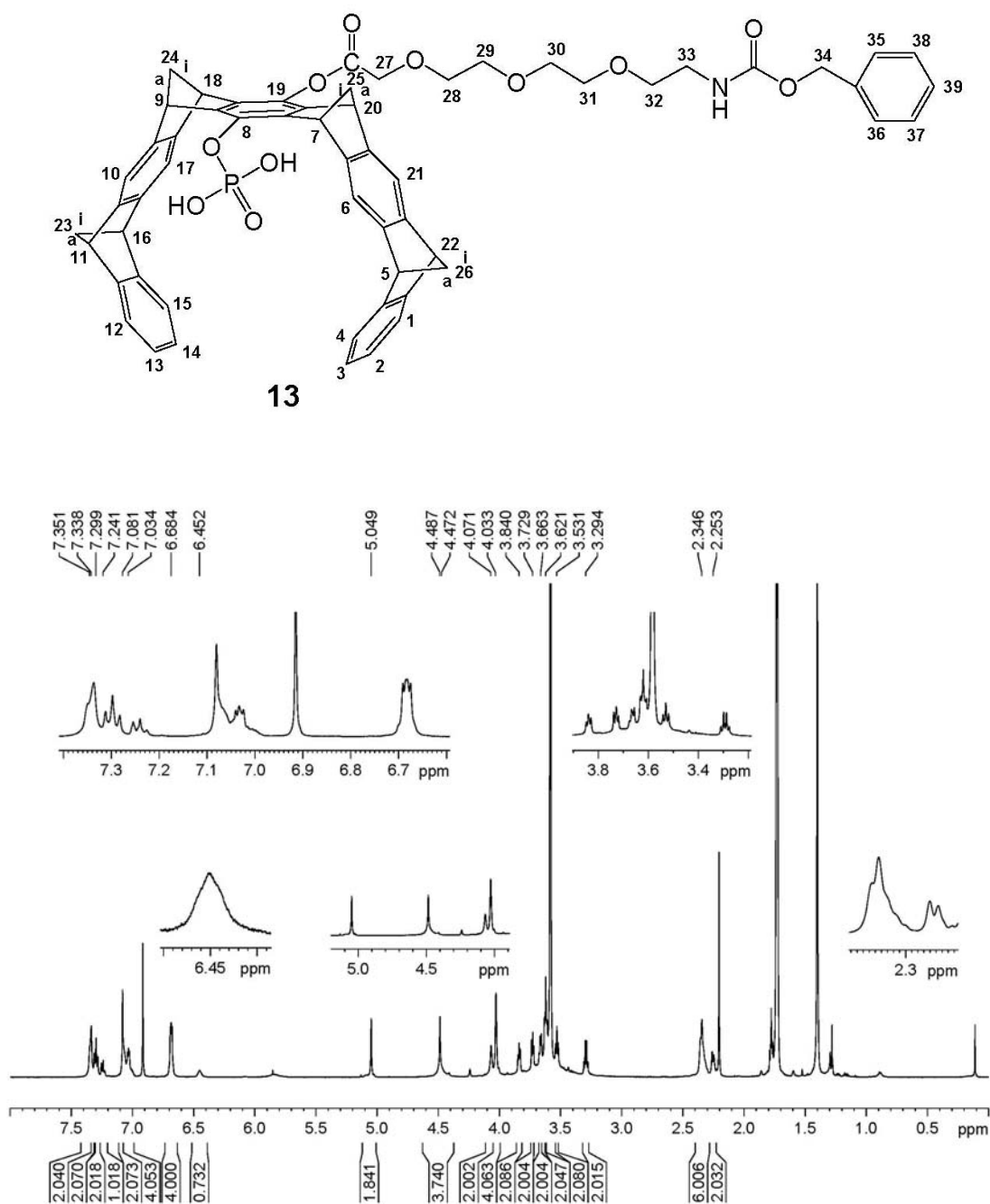
gef. 760.2953

6.6.1.3 Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Tweezers **11a** zu **13**



In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Schutzgas 45.0 mg (0.05 mmol) monosubstituierter Hydroxy-Tweezer **11a** in 30 mL absolutem THF suspendiert. Diese auf 0 °C gekühlte Suspension wurde mit 156 mg (93 µL, 1.02 mmol) Phosphoroxychlorid versetzt. Nach weiteren 10 Minuten wurden 36 µL (26.0 mg, 0.26 mmol) Triethylamin dazu gegeben. Die Suspension wurde 1 h lang bei 0 °C gerührt. Danach wurde die noch kalte Reaktionsmischung über eine D4-Fritte abfiltriert und das Filtrat im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt. Die Aufarbeitung erfolgte analog 6.4.4.

Ausbeute an **13**: 47.0 mg (0.05 mmol, 98%); Schmp: 188 °C



¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, THF-d₈): δ [ppm] = 2.25 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.35 (m(br), 6 H, H-23i, H-23a, H-24i, H-25i, H-26i, H-26a), 3.29 (q, 2 H, H-33), 3.53 (t, 2 H, H-32), 3.62 (t, 2 H, H-30), 3.66 (t, 2 H, H-31), 3.73 (t, 2 H, H-28), 3.84 (t, 2 H, H-29), 4.03 (t, 4 H, H-5, H-7, H-9, H-11), 4.07 (t(br), 2 H, H-16, H-22), 4.48 (t(br), 2 H, H-18, H-20), 4.49 (s, 2 H, H-27), 5.05 (s, 2 H, H-34), 6.45 (s(br), 1 H, NH), 6.68 (dd, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.03 (d, 4 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.08 (s, 2 H, H-17, H-21), 7.24 (m, 1 H, H-39), 7.30, 7.33 (m, 4 H, H-35, H-36, H-37, H-38), 7.53 (s, 2 H, H-6, H-10)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = 41.9 (C-33), 49.8, (C-18, C-20), 49.9 (C-7, C-9), 52.3 (C-5, C-11, C-16, C-22), 66.6 (C-34), 69.1 (C-27), 69.6, 71.0 (C-23, C-24, C-25, C-26), 71.1 (C-32), 71.3 (C-30), 71.6 (C-31), 71.7 (C-28), 71.9 (C-29), 116.9 (C-17, C-21), 119.0 (C-6, C-10), 122.0, 122.4 (C-1, C-4, C-12, C-15), 125.2 (C-2, C-3, C-13, C-14), 128.5 (C-39), 128.7, 129.1 (C-35, C-36, C-37, C-38), 138.8 (C-34a), 143.0 (C-7a, C-8a, C-8, C-18a, C-19a, C-19), 148.2 (C-6a, C-9a, C-17a, C-20a), 151.8 (C-5a, C-10a, C-16a, C-21a), 152.7 (C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 157.2 (CONH), 168.9 (COO)

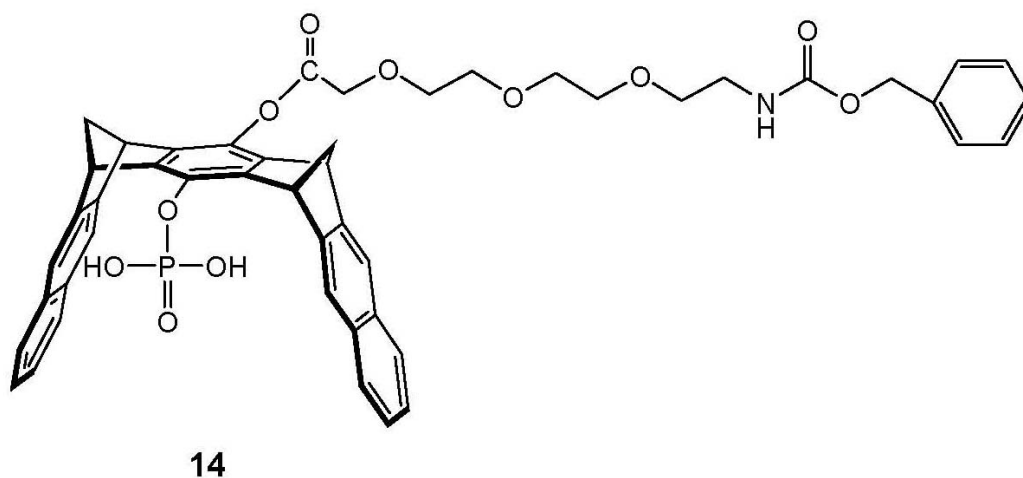
^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = -3.49

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3637 (-OH), 3407 (-CONH), 3064 (-C=CH₂), 2962, 2936, 2864 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1778, 1721 (-C=O), 1526 (-CONH Amid II), 1456 (Ringschwingung), 1275 (-P=O, -CONH Amid I), 1120 (-P=O)

Molmassenfeinbestimmung: $\text{C}_{58}\text{H}_{52}\text{NO}_{11}\text{P}$

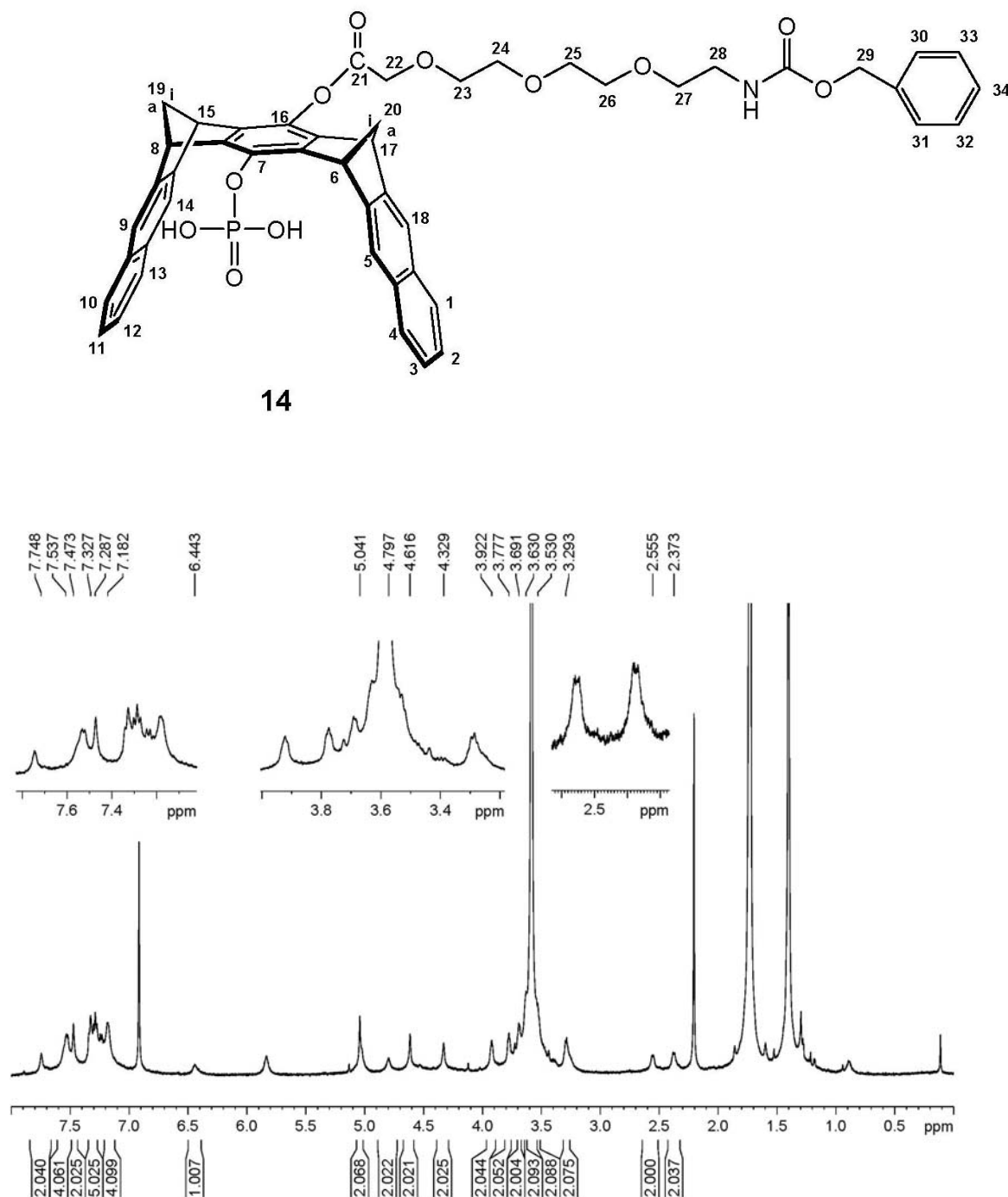
m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:	ber. 992.3211
	gef. 992.3290

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$:	ber. 968.3205
	gef. 968.3207

6.6.1.4 Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Clips 12a zu 14

In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 45.0 mg (0.06 mmol) der Verbindung **12a** in 30 mL absolutem THF suspendiert. Zu dieser auf 0 °C gekühlten Suspension wurden mittels Einwegspritze 190 mg (113 µL, 1.24 mmol) Phosphoroxychlorid gegeben. Nach 10 Minuten wurden 41 µL (30.0 mg, 0.30 mmol) Triethylamin dazu getropft. Die Suspension wurde 1 h lang bei 0 °C gerührt. Danach wurde die noch kalte Reaktionsmischung über eine D4-Fritte abfiltriert und das Filtrat in einen 100 mL-Stickstoffkolben überführt. Die Aufarbeitung erfolgte analog 6.4.4.

Ausbeute an **14**: 49.0 mg (0.05 mmol, 97%); Schmp: 196 °C



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 2.37 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.56 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 3.29 (t, 2 H, H-28), 3.53 (t, 2 H, H-27), 3.63 (t, 2 H, H-25), 3.69 (t, 2 H, H-26), 3.78 (t, 2 H, H-23), 3.92 (t, 2 H, H-24), 4.33 (dd, 2 H, H-6, H-8), 4.62 (s, 2 H, H-22), 4.80 (dd, 2 H, H-15, H-17), 5.04 (s, 2 H, H-29), 6.44 (t(br), 1 H, NH), 7.18 (m, 4 H, H-2, H-3, H-11, H-12), 7.29, 7.33 (m, 5 H, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34), 7.47 (s, 2 H, H-14, H-18), 7.53 (m, 4 H, H-1, H-4, H-10, H-13), 7.75 (s, 2 H, H-5, H-9)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = 41.8 (C-28), 48.9 (C-6, C-8), 49.2 (C-15, C-17), 65.8 (C-19, C-20), 66.4 (C-29), 68.9 (C-22), 71.1 (C-27), 71.3 (C-25), 71.5 (C-26), 71.7 (C-23); 71.9 (C-24), 120.3 (C-14, C-18), 122.3 (C-5, C-9), 125.6 (C-2, C-3, C-11, C-12), 128.3 (C-1, C-4, C-10, C-13), 128.6 (C-30, C-31, C-32, C-33, C-34)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = -3.77

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3641 (-OH), 3411 (-CONH), 3058 (-C=CH₂), 2956, 2870 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1777, 1716 (-C=O), 1523 (-CONH Amid II), 1469, 1431 (Ringschwingung), 1278, 1233 (-P=O, -CONH Amid I), 1120 (-P=O)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{48}\text{H}_{44}\text{NO}_{11}\text{P}$

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

ber. 864.2544

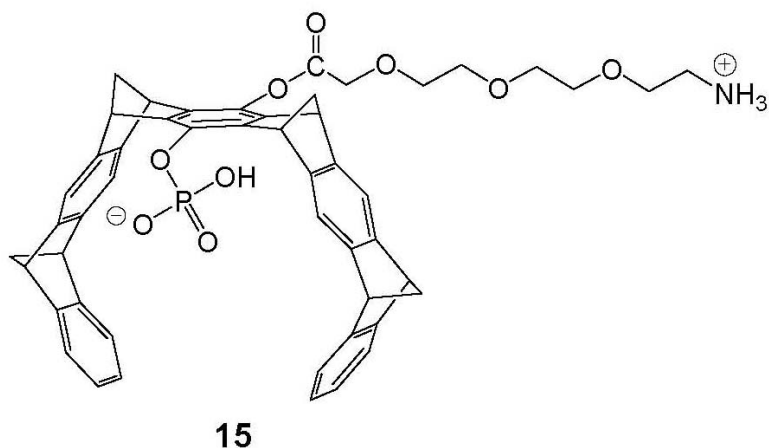
gef. 864.2587

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$:

ber. 840.2579

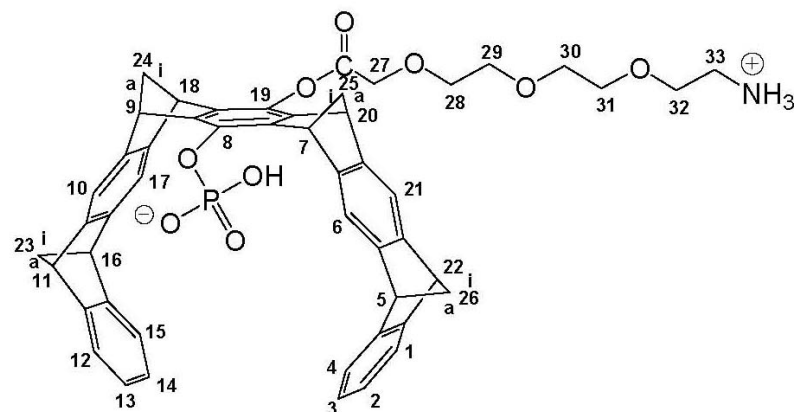
gef. 840.2583

6.6.1.5 Abspaltung der Z-Schutzgruppe unter Bildung von **15**

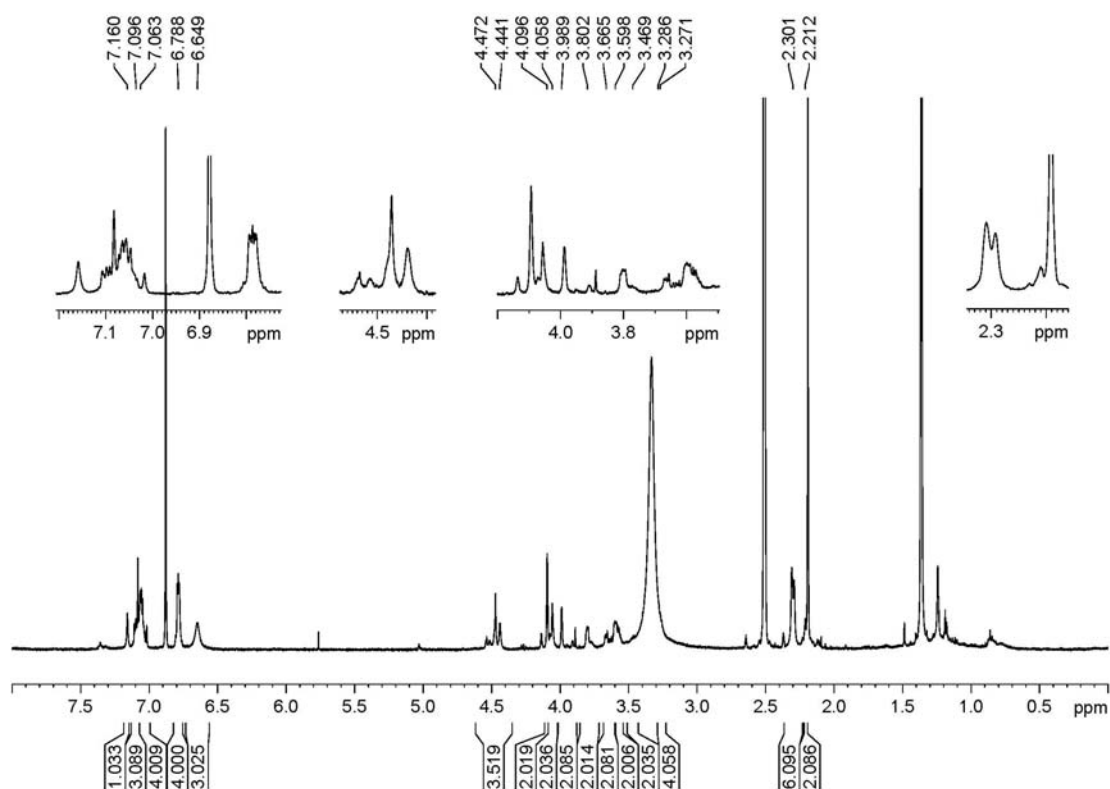


In einem 100 mL-Stickstoffkolben wurden 100.0 mg (0.10 mmol) Z-geschützter Monophosphat-Tweezer **13** in 25 mL THF p.a. gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine Spatelspitze Pd/C gegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung dreimal evakuiert und jeweils mit H_2 begast. Man ließ die Reaktionsmischung 24 h lang bei RT unter H_2 -Atmosphäre rühren. Nachdem das Ende der Hydrierung mittels Massen-Spektroskopie festgestellt werden konnte, wurde der Katalysator über Cellite 545 abfiltriert und mehrmals mit THF nachgewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der farblose Feststoff **15** wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **15**: 86 mg (0.10 mmol, quantitativ); Schmp: 197 °C (Orangefärbung)



15



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 2.21 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.30 (m(br), 6 H, H-23i, H-23a, H-24i, H-25i, H-26i, H-26a), 3.27 (m, 2 H, H-33), 3.29 (m, 2 H, H-30), 3.46 (t, 2 H, H-32), 3.60 (t, 2 H, H-31), 3.66 (t, 2 H, H-28), 3.80 (t, 2 H, H-29), 3.99, 4.06, 4.10 (3 t(br), 6 H, H-5, H-7, H-9, H-11, H-16, H-22), 4.44 (t(br), 2 H, H-18, H-20), 4.47 (s, 2 H, H-27), 6.65 (s(br), 3 H, NH), 6.79 (dd, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.05 (d, 4 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.10, 7.16 (2 s, 4 H, H-6, H-10, H-17, H-21)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = 40.4 (C-33), 49.7, (C-18, C-20), 50.0 (C-7, C-9), 52.1 (C-5, C-11, C-16, C-22), 69.2 (C-27), 70.1 (C-23, C-24, C-25, C-26), 70.3 (C-32), 70.7 (C-30), 71.7 (C-31), 71.9 (C-28), 73.3 (C-29), 117.8 (C-17), 119.7 (C-21), 122.3 (C-1, C-4, C-12, C-15), 125.2, 125.5, 125.6, 125.7 (C-2, C-3, C-13, C-14), 126.2 (C-6, C-10), 128.7, 143.4 (C-7a, C-8a, C-8, C-18a, C-19a, C-19), 148.1 (C-6a, C-9a, C-17a, C-20a), 149.4 (C-5a, C-10a, C-16a, C-21a), 151.9 (C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 169.3 (COO)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, THF- d_8): δ [ppm] = -2.49

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3640 (-OH), 2956, 2926, 2862 (-C-H, -CH₂, -CH₃), 1773, 1759 (-C=O), 1618 (-NH₂), 1465 (Ringschwingung), 1431 (-CH₂), 1276 (-P=O), 1120 (-P=O)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{50}\text{H}_{46}\text{NO}_9\text{P}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 836.2983

gef. 836.2989

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

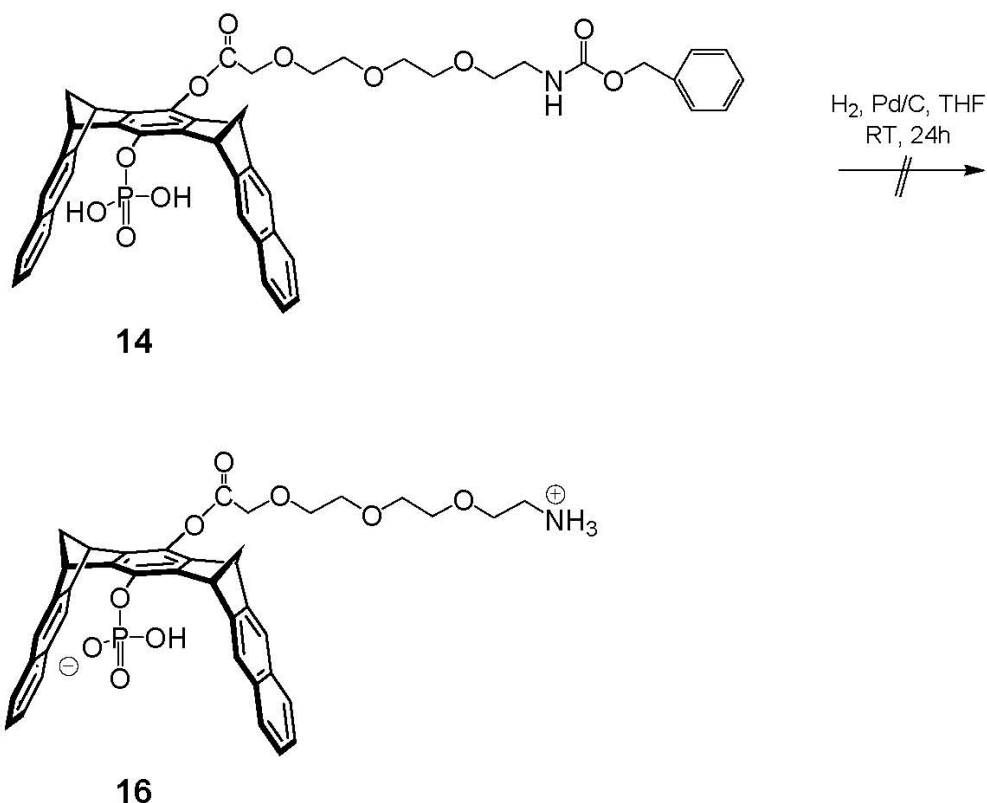
ber. 858.2802

gef. 858.2815

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$:

ber. 834.2837

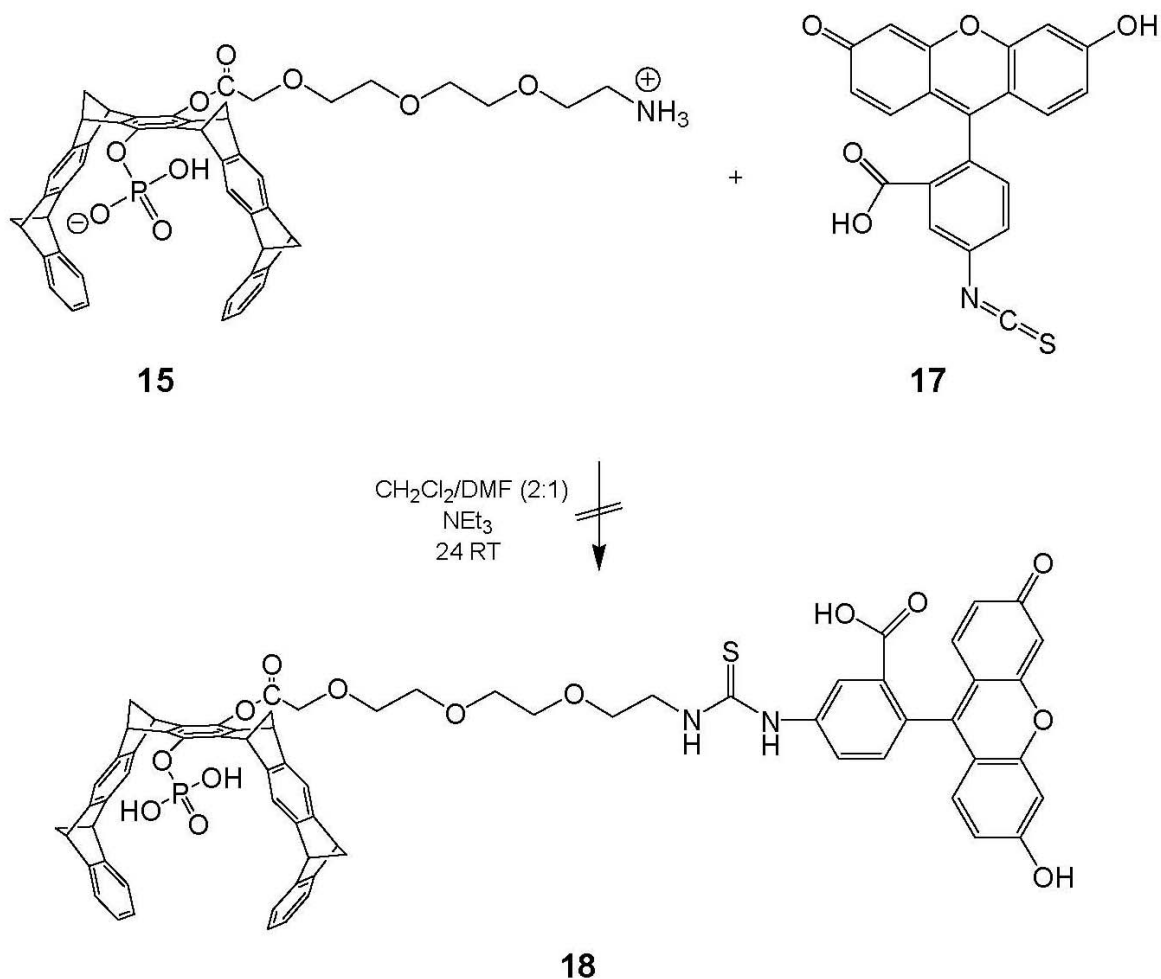
gef. 834.2868

6.6.1.6 Versuch der Abspaltung der Z-Schutzgruppe unter Bildung von 16

In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden 38.0 mg (0.05 mmol) der Verbindung **14** in 20 mL Methanol/THF (v/v 3:1) gelöst. Zu dieser braunen Lösung wurde eine Spatelspitze Pd/C gegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung dreimal evakuiert und jeweils mit H_2 begast. Man ließ die Reaktionsmischung 72 h lang bei RT unter H_2 -Atmosphäre rühren. Dabei wurde das Ende der Hydrierung mittels Massen-Spektroskopie überprüft. Nachdem kein Produkt-Signal detektiert werden konnte wurde der Katalysator nach 3 Tagen Rühren über Cellite 545 abfiltriert und mit viel THF nachgewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Bei dem Feststoff handelte es sich allerdings nicht um das gewünschte Produkt **16**.

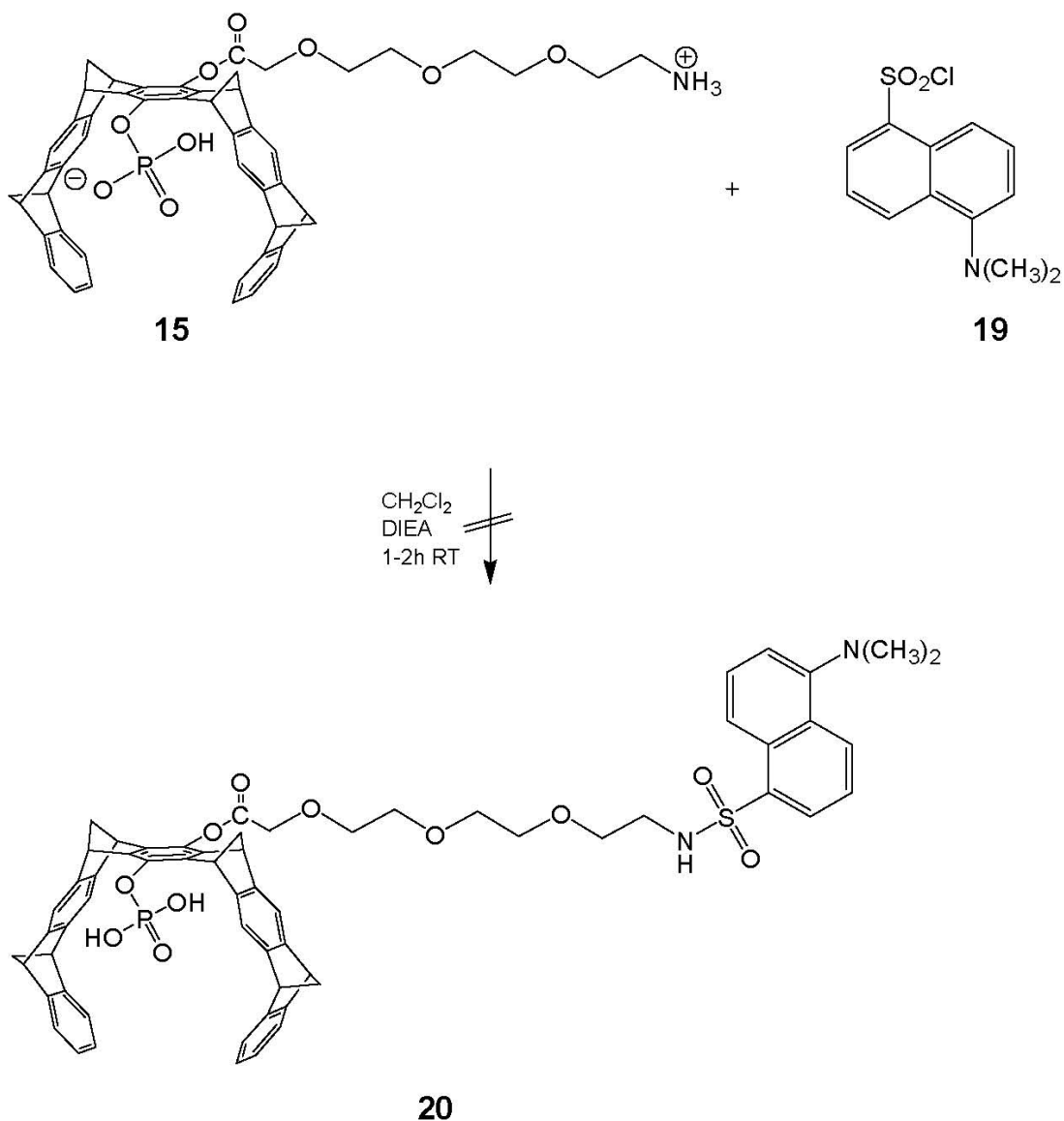
6.6.1.7 Syntheseveruche zur Einführung einer Sonde in den Tweezer 750

6.6.1.7.1 Einführung der Fluoreszenzsonde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) unter Bildung von **18**



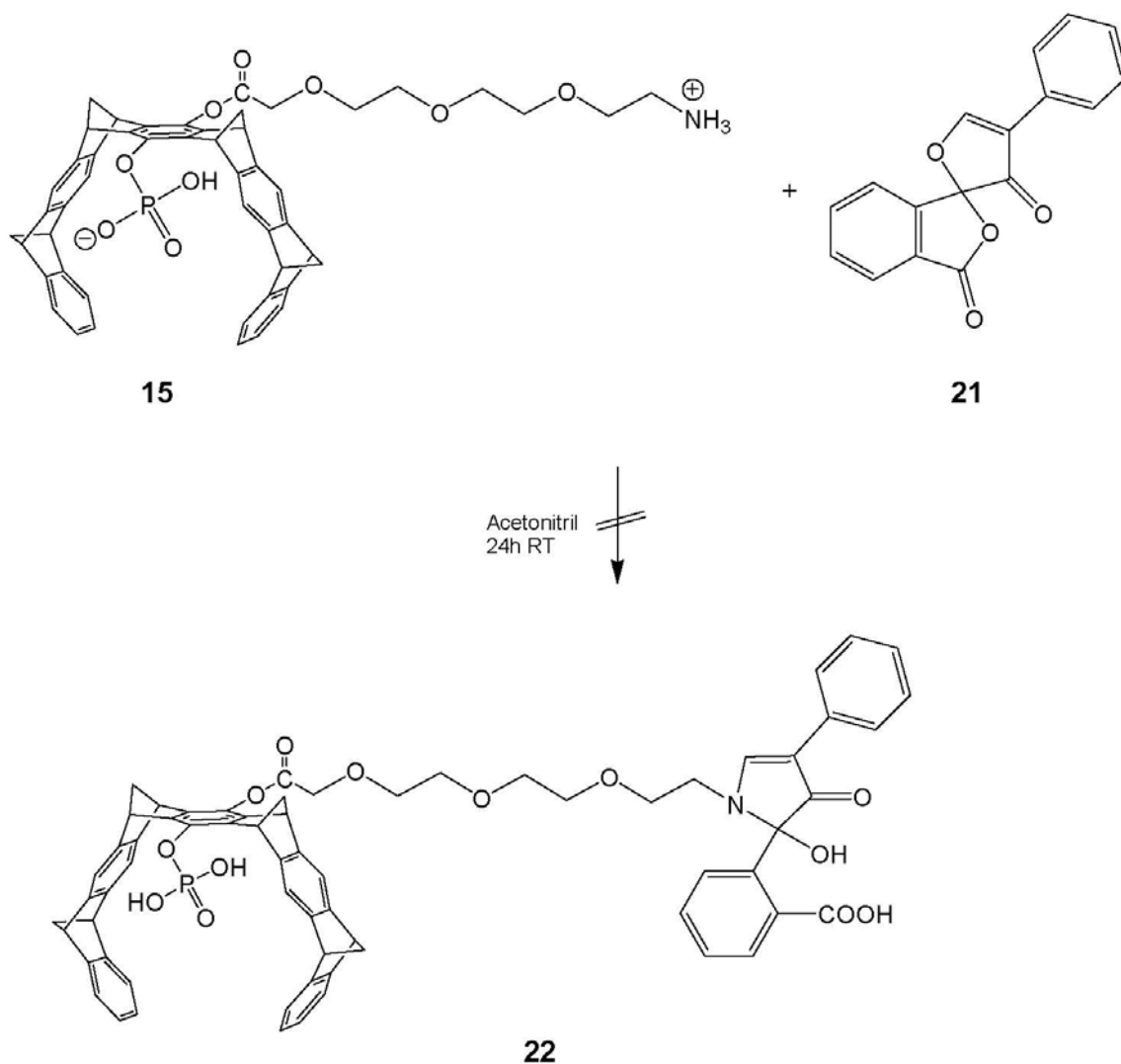
In einem 10 mL-Stickstoffkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 5.0 mg (6.23 μmol) entschützter Tweezer **15** in 6 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (v/v 2:1) gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit 145.0 mg (200 μL , 1.43 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wurden 3.8 mg (0.01 mmol) Fluoresceinisothiocyanat (**17**) dazugegeben. Die gelbe Lösung wurde unter Lichtausschluss 24 h lang bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Bei dem Feststoff handelte es sich allerdings nicht um das gewünschte Produkt **18**.

6.6.1.7.2 Einführung der Fluoreszenzsonde Dansylchlorid (19) unter Bildung von 20



In einem 10 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 10.1 mg (12.1 μmol) der Verbindung **15** in 5 mL absolutem CH_2Cl_2 gelöst. Die Lösung wurde mit 4.0 mg (14.9 μmol) Dansylchlorid (**19**) und 4.7 mg (6 μL , 36.0 μmol) Diisopropylethylamin versetzt und 1-2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Es fand keine Produktumsetzung statt.

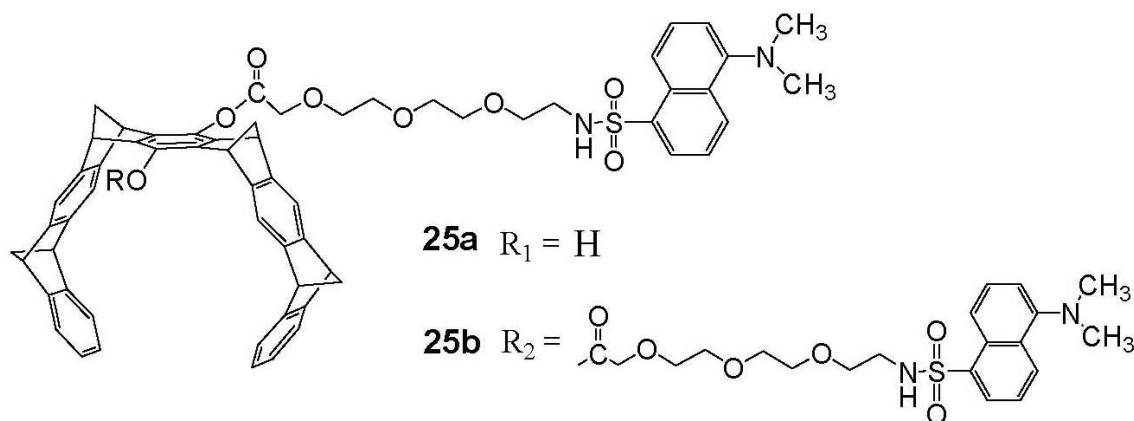
6.6.1.7.3 Einführung der Fluoreszenzsonde Fluorescamin (**21**) unter Bildung von **22**



In einem 10 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 4.5 mg (5.41 μmol) entschützter Tweezer **15** in 5 mL Acetonitril p.a. gelöst. Diese auf 0 °C gekühlte Suspension wurde mit 1.5 mg (5.43 μmol) Fluorescamin (**21**) versetzt und 24 h lang bei RT gerührt. Dabei ging die Suspension in eine klare Lösung über, die anschließend vom Lösungsmittel befreit wurde. Bei dem Feststoff handelte es sich allerdings nicht um das gewünschte Produkt **22**.

6.6.2 Zweite Syntheseroute

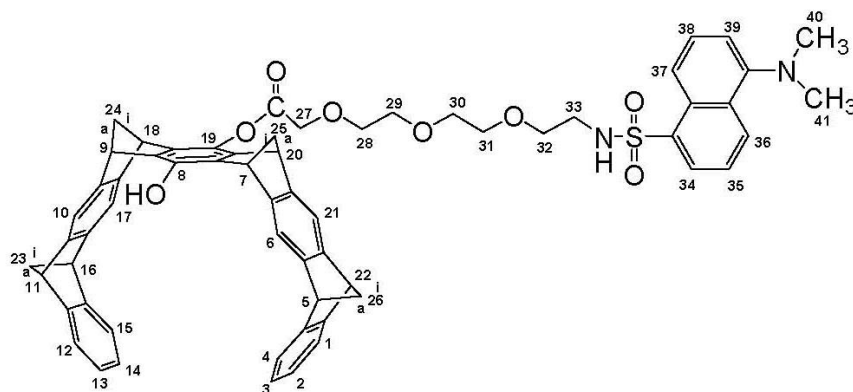
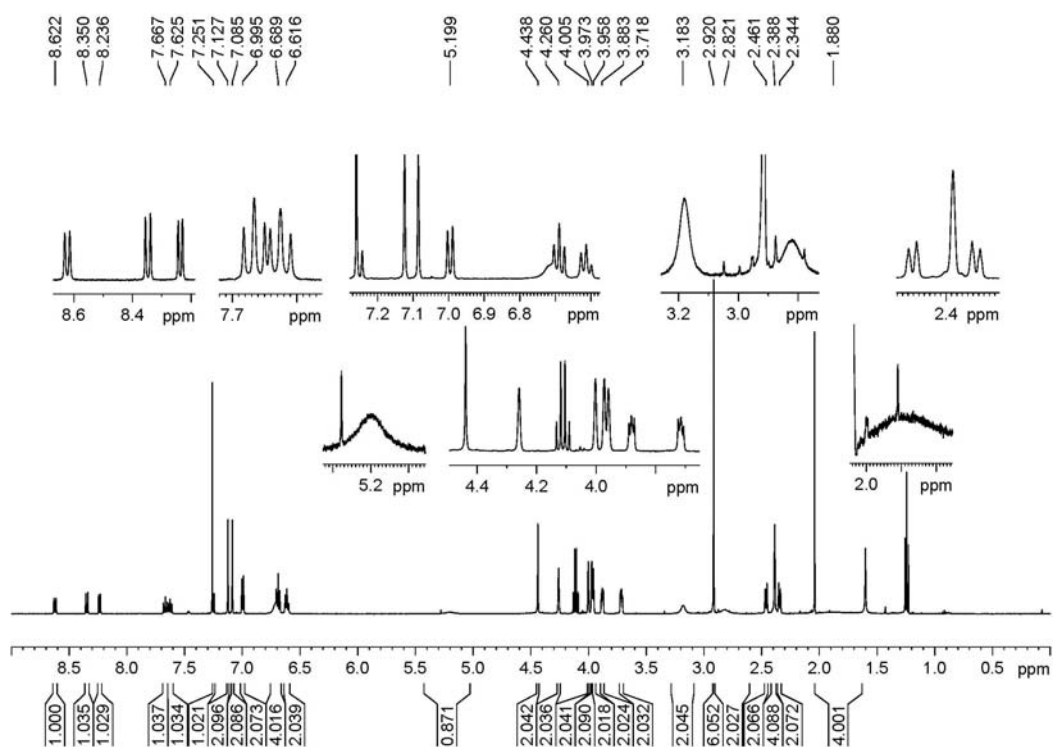
6.6.2.1 Veresterung des Dansylmarkierten TEG-Linkers 24 mit dem Bis-Hydroxy-Tweezer 29S unter Bildung des Produktgemisches aus 25a und 25b



In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 89.0 mg (0.20 mmol) Dansylmarkierter TEG-Linker **24** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT mit 107.0 mg (0.20 mmol) PyBOP und nach weiteren 15 Minuten mit 63.0 mg (68 μ L, 0.62 mmol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Die klare Lösung wurde auf 40 °C erwärmt. Parallel dazu wurden in einem 100 mL-Stickstoffkolben ebenfalls unter Argon 125.0 mg (0.22 mmol) Bis-Hydroxy-Tweezer **29S** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und auf 40 °C erhitzt. Zu dieser Lösung wurde dann langsam das erste Reaktionsgemisch getropft und anschließend 24 h lang bei 40 °C gerührt. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan (v/v 1:1) gereinigt. Das monosubstituierte Produkt **25a** ($R_F = 0.32$) konnte als gelbgrüner kristalliner Feststoff isoliert werden. Um das bisubstituierte Produkt **25b** ($R_F = 0.67$) zu isolieren musste das Laufmittelgemisch verdünnt werden (40:1 v/v).

Ausbeute an **25a**: 87.0 mg (0.09 mmol, 45%); Schmp: 161 °C

Ausbeute an **25b**: 92.0 mg (0.07 mmol, 35%); Schmp: 148 °C

**25a**

^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 1.88 (t(br), 4 H, H-32, H-33), 2.34 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.39 (m, 4 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a), 2.46 (dt, 2 H, H-24i, H-25i), 2.83 (t, 2 H, H-30), 2.92 (s, 6 H, H-40, H-41), 3.18 (t, 2 H, H-31), 3.72 (t, 2 H, H-28), 3.88 (t, 2 H, H-29), 3.96 (t, 2 H, H-7, H-9), 3.97 (t, 2 H, H-5, H-11), 4.01 (t, 2 H, H-16, H-22), 4.26 (t, 2 H, H-18, H-20), 4.44 (s, 2 H, H-27), 5.20 (t(br), 1 H, NH), 6.61 (dd, 2 H, H-3, H-13), 6.69 (dd, 4 H, H-2, H-4, H-12, H-14), 7.00 (dd, 2 H, H-1, H-15), 7.09 (s, 2 H, H-6, H-10), 7.13 (s, 2 H, H-17, H-21), 7.25 (d, 1 H, H-36), 7.63 (dd, 1H, H-38), 7.67 (dd, 1 H, H-35), 8.24 (d, 1 H, H-37), 8.35 (d, 1 H, H-34), 8.62 (d, 1 H, H-39)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 45.6 (C-40,C-41), 47.5 (C-18, C-20), 48.8 (C-5, C-11), 51.2 (C-7, C-9, C-16, C-22), 67.8 (C-32, C-33), 68.7 (C-23, C-27, C-26), 68.7 (C-31), 68.8 (C-30), 69.4 (C-24, C-25), 70.3 (C-28); 70.6 (C-29), 115.5 (C-36), 116.6 (C-17, C-21), 116.8 (C-6, C-10), 119.3 (C-34), 121.4 (C-4, C-12), 121.6 (C-1, C-15), 123.3 (C-38), 124.5 (C-3, C-13), 124.7 (C-2, C-14), 128.4 (C-35), 129.6 (C-37), 129.9 (C-37a), 130.1 (C-34a), 130.5 (C-39), 135.2 (C-36a), 137.0 (C-7a, C-8a, C-8), 140.7 (C-18a, C-19a, C-19), 146.6 (C-17a, C-20a), 147.0 (C-6a, C-9a), 147.5 (C-5a, C-10a, C-16a, C-21a), 150.5 (C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 152.1 (C-39a), 169.1 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3441 cm^{-1} (-OH, -N-H), 3064 (=C-H), 2972, 2934, 2863, 2784 (-C-H, -CH₂, -CH₃, N-CH₃), 1772, 1732, 1705 (-C=O), 1613 (-N-H), 1574, 1474 (Ringschwingung), 1454, 1413 (-CH₂, -CH₃), 1321 (-C-N, -SO₂-N), 1275 (-C-O-C), 1142 (-SO₂, -COC), 837 (=C-H), 791, 754 (=C-H, -C-S)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{62}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 989.3830

gef. 989.3880

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

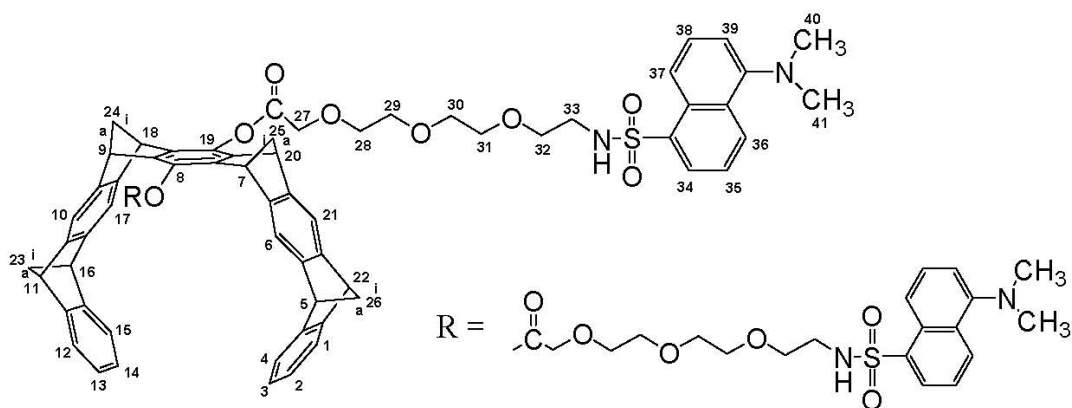
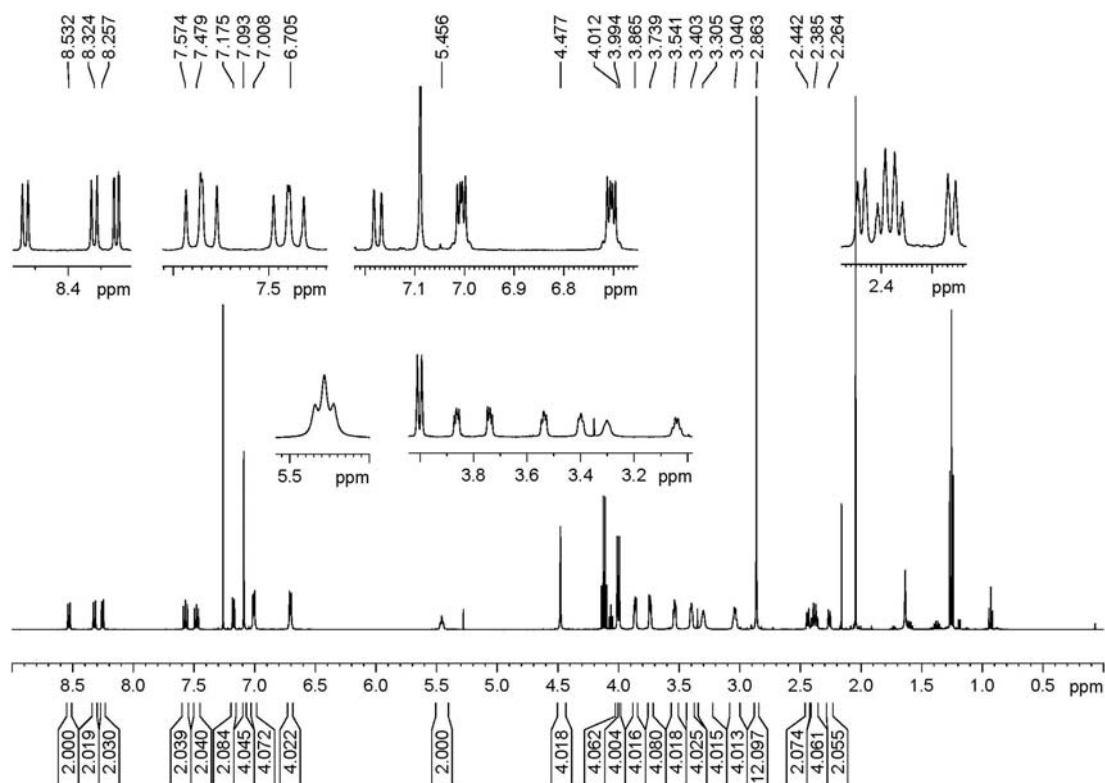
ber. 1011.3650

gef. 1011.3678

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$:

ber. 987.3685

gef. 987.3687

**25b**

^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 2.26 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.39 (m, 4 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a), 2.44 (dt, 2 H, H-24i, H-25i), 2.86 (s, 12 H, H-40, H-41), 3.04 (q, 4 H, H-33), 3.31 (q, 2 H, H-32), 3.40 (t, 2 H, H-30), 3.54 (t, 2 H, H-31), 3.74 (t, 2 H, H-28), 3.87 (t, 2 H, H-29), 3.99 (t, 4 H, H-5, H-7, H-9, H-11), 4.01 (t, 4 H, H-16, H-18, H-20, H-22), 4.48 (s, 4 H, H-27), 5.46 (t(br), 2 H, NH), 6.71 (dd, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.01 (dd, 4 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.09 (s, 4 H, H-6, H-10, H-17, H-21), 7.18 (d, 2 H, H-36), 7.48 (t, 2H, H-38), 7.57 (t, 2 H, H-35), 8.26 (d, 2 H, H-37), 8.32 (d, 2 H, H-34), 8.53 (d, 2 H, H-39)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 43.0 (C-33), 45.5 (C-40,C-41), 48.8 (C-5, C-7, C-9, C-11), 51.3 (C-16, C-18, C-20, C-22), 68.4 (-27), 69.0 (C-23, C-26), 69.4 (C-32), 70.1 (C-30), 70.2 (C-31); 70.3 (C-28), 70.4 (C-24, C-25), 70.8 (C-29), 115.3 (C-36), 116.7 (C-6, C-10, C-17, C-21), 119.1 (C-34), 121.5 (C-1, C-4, C-12, C-15), 123.4 (C-38), 124.7 (C-2, C-3, C-13, C-14), 128.5 (C-35), 129.6 (C-37), 129.7 (C-37a), 130.0 (C-34a), 130.6 (C-39), 135.1 (C-36a), 136.7 (C-7a, C-8a, C-8), 141.8 (C-18a, C-19a, C-19), 146.2 (C-6a, C-9a, C-17a, C-20a), 147.8 (C-5a, C-10a, C-16a, C-21a), 150.4 (C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 152.1 (C-39a), 169.0 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3372 cm^{-1} (-N-H), 3052 (=C-H), 2975, 2938, 28, 2790 (-C-H, -CH₂, -CH₃, N-CH₃), 1766, 1730 (-C=O), 1613 (-N-H), 1574 (Ringschwingung), 1465, 1410 (-CH₂, -CH₃), 1322 (-C-N, -SO₂-N), 1275 (-C-O-C), 1146 (-SO₂, -COC), 847 (=C-H), 792, 756 (=C-H, -C-S)

Molmassenfeinbestimmung:

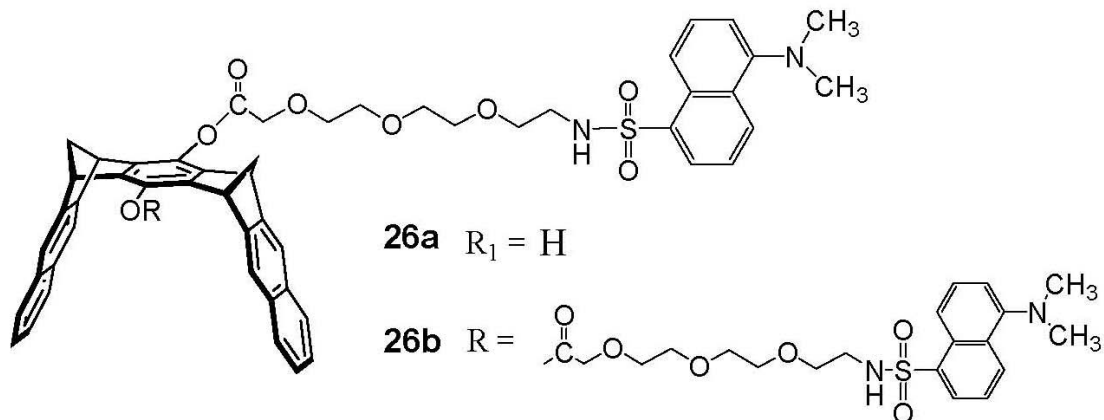
$\text{C}_{82}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}_2$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 1411.5342
 gef. 1411.5418

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 1433.5161
 gef. 1433.5252

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$: ber. 1409.5196
 gef. 1409.5116

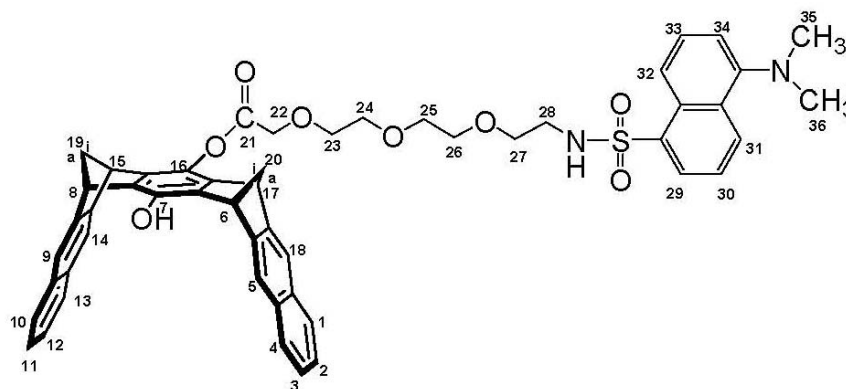
6.6.2.2 Veresterung des Dansylmarkierten TEG-Linkers **23** mit dem Bis-Hydroxy-Clip **13S** unter Bildung des Produktgemisches aus **26a** und **26b**



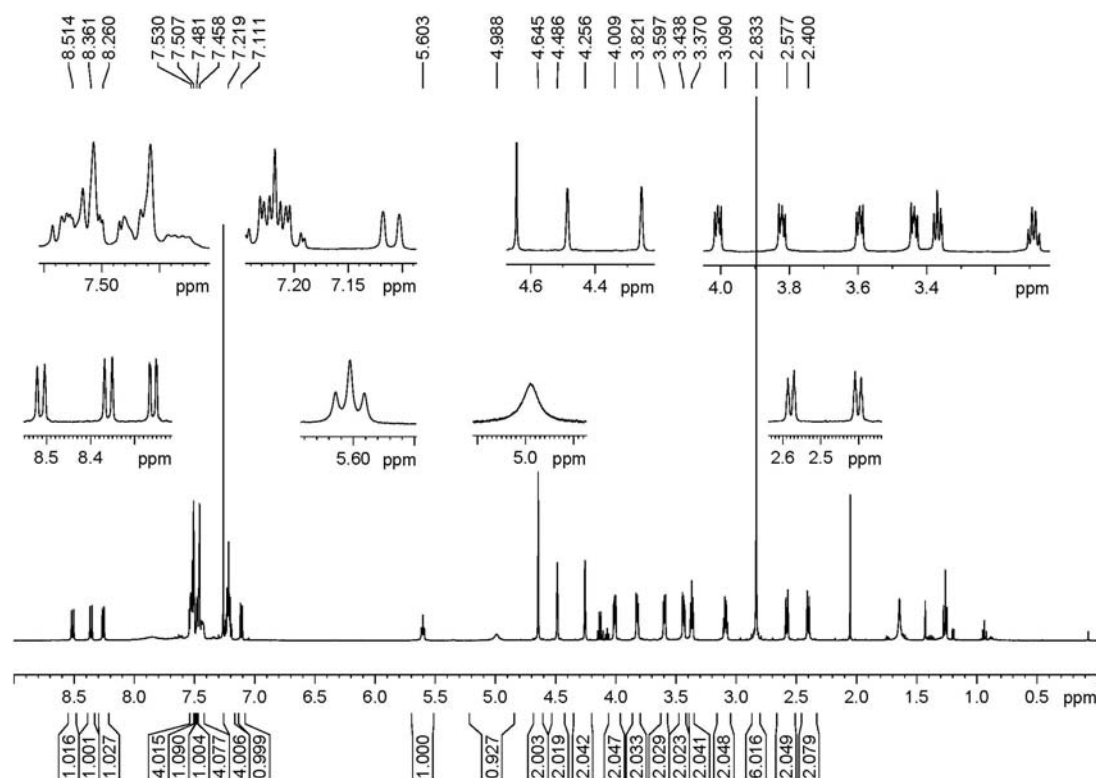
In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 120.0 mg (0.27 mmol) Dansylmarkierter TEG-Linker **24** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und bei RT mit 144.0 mg (0.27 mmol) PyBOP versetzt. Nach weiteren 15 Minuten wurden 85.0 mg (92 μL , 0.84 mmol) *N*-Methylmorpholin dazu gegeben. Die braune Lösung wurde auf 40 °C erwärmt. Parallel dazu wurden in einem 100 mL-Stickstoffkolben unter Argon 125.0 mg (0.22 mmol) Bis-Hydroxy-Clip **13S** in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst und ebenfalls auf 40 °C erhitzt. Diese Lösung wurde langsam mit dem ersten Reaktionsgemisch versetzt und 48 h lang bei 40 °C gerührt. Am nächsten Tag wurde die braune Lösung vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan (v/v 1:1) gereinigt. Man erhielt das monosubstituierte Produkt **26a** ($R_F = 0.28$) als braunen kristallinen Feststoff. Um den bisubstituierten Clip **26b** ($R_F = 0.57$) zu isolieren, wurde das Laufmittelgemisch geändert (v/v 40:1).

Ausbeute an **26a**: 87 mg (0.10 mmol, 36 %); Schmp: 108 °C

Ausbeute an **26b**: 71 mg (0.06 mmol, 24 %); Schmp: 136 °C



26a



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 2.40 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.58 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 2.83 (s, 6 H, H-35, H-36), 3.09 (q, 2 H, H-28), 3.37 (t, 2 H, H-27), 3.44 (t, 2 H, H-25), 3.60 (t, 2 H, H-26), 3.82 (t, 2 H, H-23), 4.01 (t, 2 H, H-24), 4.26 (s, 2 H, H-6, H-8), 4.49 (s, 2 H, H-15, H-17), 4.64 (s, 2 H, H-22), 4.99 (s(br), 1 H, OH), 5.60 (t(br), 1 H, NH), 7.11 (d, 1 H, H-31), 7.22 (m, 4 H, H-2, H-3, H-11, H-12), 7.46 (s, 4 H, H-5, H-9, H-14, H-18), 7.48 (dd, 1 H, H-33), 7.51 (dd, 1H, H-30), 7.53 (m, 4 H, H-1, H-4, H-10, H-13), 8.26 (d, 1 H, H-32), 8.36 (d, 1 H, H-29), 8.51 (d, 1 H, H-34)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 43.2 (C-28), 45.5 (C-35, C-36), 46.8 (C-15, C-17), 48.2 (C-6, C-8), 64.9 (C-19, C-20), 68.7 (C-22), 69.4 (C-27), 70.4 (C-25), 70.5 (C-26), 70.8 (C-23); 71.4 (C-24), 115.4 (C-31), 119.2 (C-29), 119.7, 120.3 (C-5, C-9, C-14, C-18), 123.3 (C-33), 125.3, 125.4 (C-2, C-3, C-11, C-12), 127.7, 127.8 (C-1, C-4, C-10, C-13), 128.5 (C-30), 129.5 (C-32), 129.8 (C-32a), 130.1 (C-29a), 130.5 (C-34), 132.2 (C-4a, C-9a, C-13a, C-18a), 135.0 (C-7, C-16), 135.3 (C-31a), 140.4 (C-6a, C-7a, C-15a, C-16a), 146.1 (C-5a, C-8a), 146.4 (C-14a, C-17a), 152.0 (C-34a), 169.0 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3438 cm^{-1} (-OH, -N-H), 3053 (=C-H), 2934, 2867, 2788 (-C-H, -CH₂, -CH₃, N-CH₃), 1772, 1735 (-C=O), 1612 (-N-H), 1587, 1479 (Ringschwingung), 1454 (-CH₂, -CH₃), 1317 (-C-N, -SO₂-N), 1278 (-C-O-C), 1142 (-SO₂, -COC), 834 (=C-H), 791, 750 (=C-H, -C-S)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{52}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 861.3204

gef. 861.3254

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

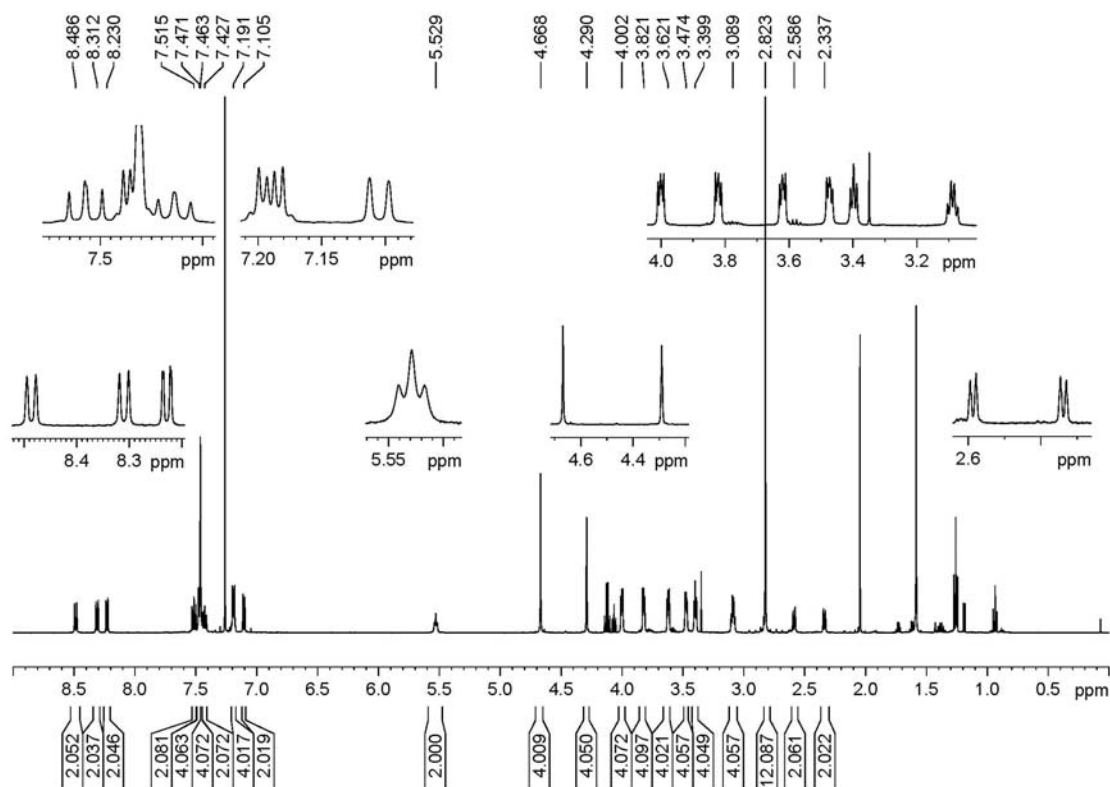
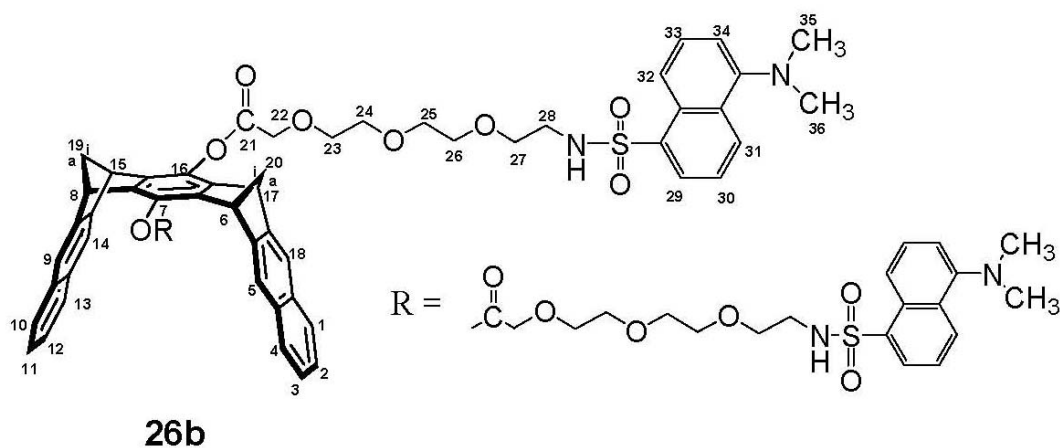
ber. 883.3024

gef. 883.3075

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$:

ber. 859.3059

gef. 859.3078



¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl₃, 298K): δ [ppm] = 2.34 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.59 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 2.82 (s, 12 H, H-35, H-36), 3.09 (q, 4 H, H-28), 3.40 (t, 4 H, H-27), 3.47 (t, 4 H, H-25), 3.62 (t, 4 H, H-26), 3.82 (t, 4 H, H-23), 4.00 (t, 4 H, H-24), 4.29 (s, 4 H, H-6, H-8, H-15, H-17), 4.67 (s, 4 H, H-22), 5.53 (t(br), 2 H, NH), 7.11 (d, 1 H, H-31), 7.19 (m, 4 H, H-2, H-3, H-11, H-12), 7.43 (dd, 2 H, H-33), 7.46 (s, 4 H, H-5, H-9, H-14, H-18), 7.47 (m, 4 H, H-1, H-4, H-10, H-13), 7.52 (dd, 2H, H-30), 8.23 (d, 2 H, H-32), 8.31 (d, 2 H, H-29), 8.49 (d, 2 H, H-34)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CDCl_3 , 298K): δ [ppm] = 43.1 (C-28), 45.5 (C-35, C-36), 48.2 (C-6, C-8, C-15, C-17), 65.1 (C-19, C-20), 68.6 (C-22), 69.5 (C-27), 70.2 (C-25), 70.4 (C-26), 70.6 (C-23), 71.2 (C-24), 115.4 (C-31), 119.1 (C-29), 120.3 (C-5, C-9, C-14, C-18), 123.4 (C-33), 125.3 (C-2, C-3, C-11, C-12), 127.8 (C-1, C-4, C-10, C-13), 128.5 (C-30), 129.6 (C-32), 129.8 (C-32a), 130.0 (C-29a), 130.6 (C-34), 132.2 (C-4a, C-9a, C-13a, C-18a), 135.1 (C-31a), 136.9 (C-7, C-16), 141.2 (C-6a, C-7a, C-15a, C-16a), 145.7 (C-5a, C-8a, C-14a, C-17a), 152.0 (C-34a), 168.8 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3374 cm^{-1} (-N-H), 3051 (=C-H), 2941, 2876, 2835, 2790 (-C-H, -CH₂, -CH₃, N-CH₃), 1765, 1723 (-C=O), 1613 (-N-H), 1574 (Ringschwingung), 1463, 1412 (-CH₂, -CH₃), 1323 (-C-N, -SO₂-N), 1278 (-C-O-C), 1146 (-SO₂, -COC), 846 (=C-H), 791, 754 (=C-H, -C-S)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{72}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{S}_2$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 1283.4716

gef. 1283.4744

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$:

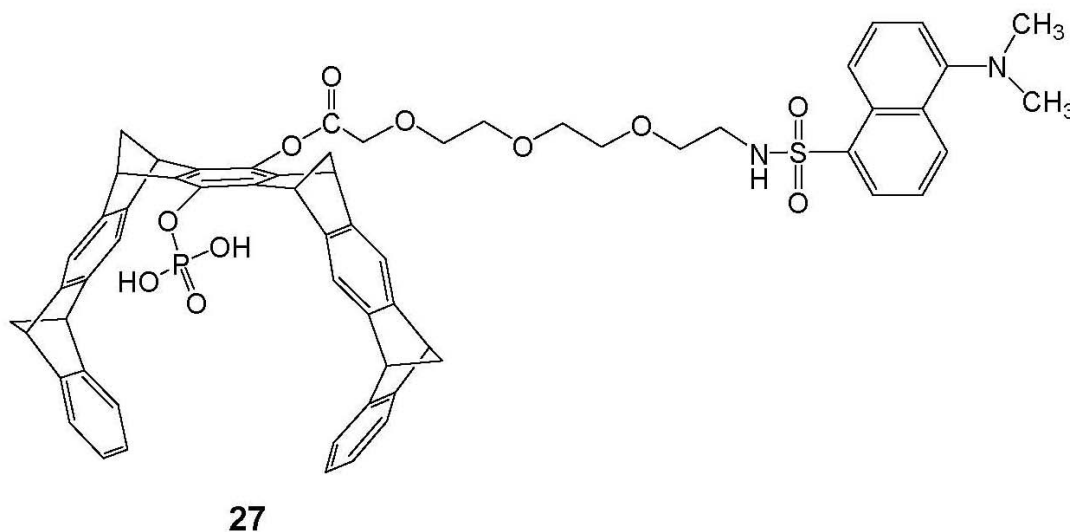
ber. 1305.4535

gef. 1305.4573

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$:

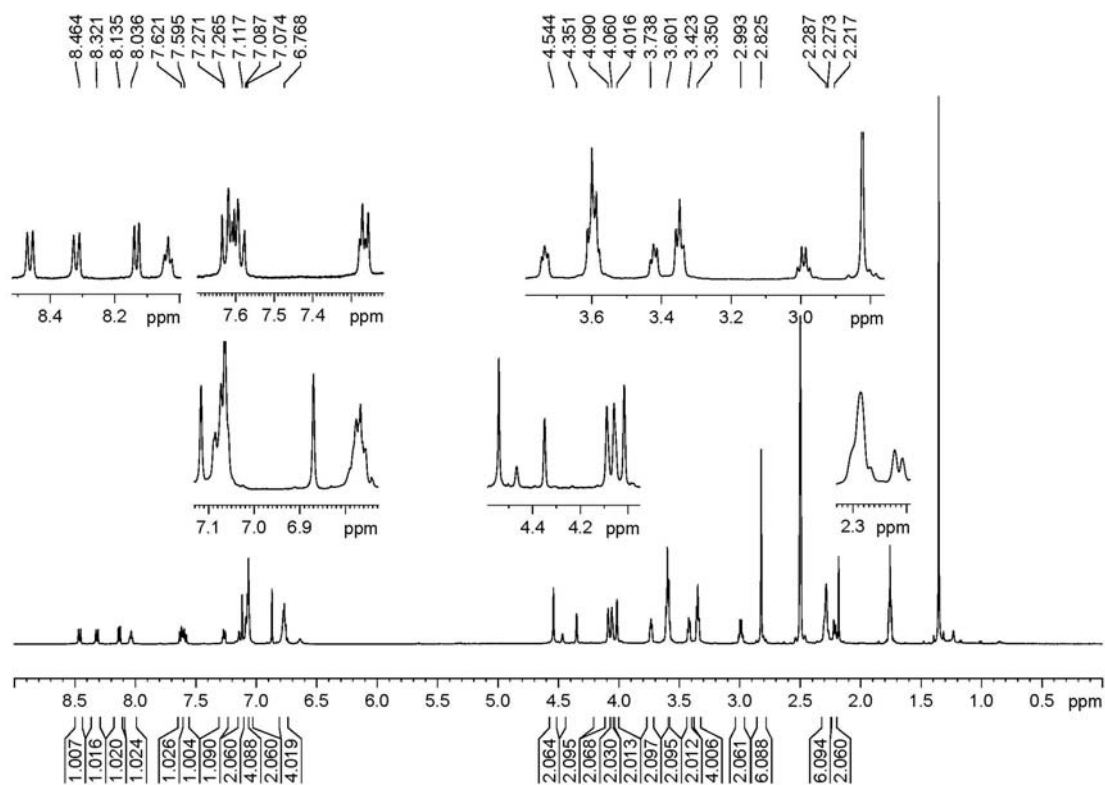
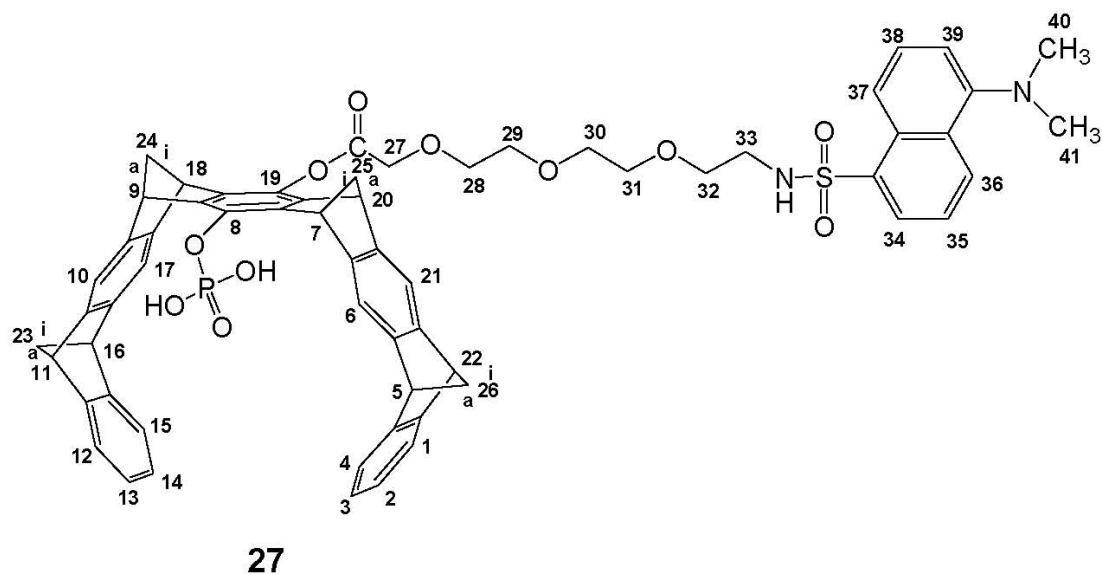
ber. 1281.4570

gef. 1281.4442

6.6.2.3 Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Tweezers 25a zu 27

In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 40.0 mg (0.04 mmol) der Verbindung **25a** in 30 mL absolutem THF suspendiert und bei 0 °C mit 125 mg (74 µL, 1.02 mmol) Phosphoroxychlorid versetzt. Nach weiteren 10 Minuten wurden 21.0 mg (29 µL, 0.21 mmol) Triethylamin dazu getropft. Die Suspension wurde 1 h lang bei 0 °C gerührt. Danach wurde die noch kalte Reaktionsmischung über eine D4-Fritte abfiltriert und das Filtrat im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt. Die Aufarbeitung erfolgte analog 6.4.4.

Ausbeute an **27**: 38 mg (0.04 mmol, 88%); Schmp: 267 °C Zersetzung



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 2.22 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.27 (dt, 2 H, H-24i, H-25i), 2.29 (m(br), 4 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a), 2.83 (s, 12 H, H-40, H-41), 2.99 (q, 4 H, H-33), 3.35 (q, 4 H, H-30, H-32), 3.42 (t, 2 H, H-31), 3.60 (t, 2 H, H-28), 3.74 (t, 2 H, H-29), 4.02 (t(br), 2 H, H-9, H-11), 4.06 (t(br), 2 H, H-5, H-7), 4.09 (t(br), 2 H, H-16, H-18), 4.35 (t(br), 2 H, H-20, H-22), 4.54 (s, 2 H, H-27), 6.77 (dd, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.07 (s, 4 H, H-6, H-10), 7.09 (dd, 2 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.12 (s, 2 H, H-17, H-21), 7.27 (d, 1 H, H-36), 7.60 (t, 1 H, H-38), 7.62 (t, 1 H, H-35), 8.04 (t, 1 H, NH), 8.14 (d, 1 H, H-37), 8.32 (d, 1 H, H-34), 8.46 (d, 1 H, H-39)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 42.3 (C-33), 45.1 (C-40, C-41), 47.6 (C-9, C-11), 48.0 (C-20, C-22), 50.2 (C-5, C-7), 50.3 (C-16, C-18), 67.5 (C-27), 67.8 (C-23, C-26), 68.6 (C-32), 69.0 (C-24, C-25), 69.5 (C-31), 69.6 (C-28), 69.7 (C-30), 70.2 (C-29), 115.1 (C-34), 116.2 (C-6, C-10), 117.1 (C-17, C-21), 119.3 (C-34), 121.4, 121.6 (C-1, C-4, C-12, C-15), 123.6 (C-38), 124.4, 124.5 (C-2, C-3, C-13, C-14), 127.7 (C-35), 128.0 (C-37), 129.1 (C-37a, C-34a), 129.2 (C-39), 136.4 (C-36a), 141.3 (C-7a, C-8a, C-8), 141.7 (C-18a, C-19a, C-19), 146.2, 146.5 (C-6a, C-9a, C-17a, C-20a), 147.2 (C-5a, C-10a, C-16a, C-21a), 150.1 (C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 151.3 (C-39a), 168.8 (COO)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -5.51

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3641 (-OH), 3061 (=C-H), 2963, 2936, 2864 (-C-H, -CH₂, -CH₃, N-CH₃), 1774 (-C=O), 1632 (-N-H), 1575 (Ringschwingung), 1467 (-CH₂, -CH₃), 1324 (-C-N, -SO₂-N), 1275 (-C-O-C, -P=O), 1230 (P-O-Aryl), 1142 (-SO₂, -COC), 846 (=C-H), 793, 755 (=C-H, -C-S)

Molmassenfeinbestimmung:

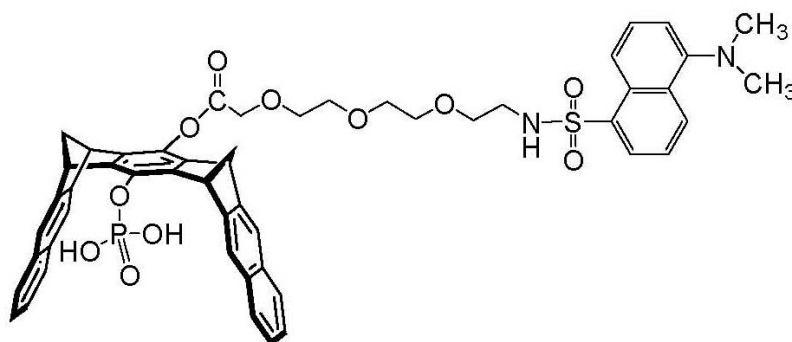
$\text{C}_{62}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{PS}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 1069.3493
gef. 1069.3507

m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 1091.3313
gef. 1091.3335

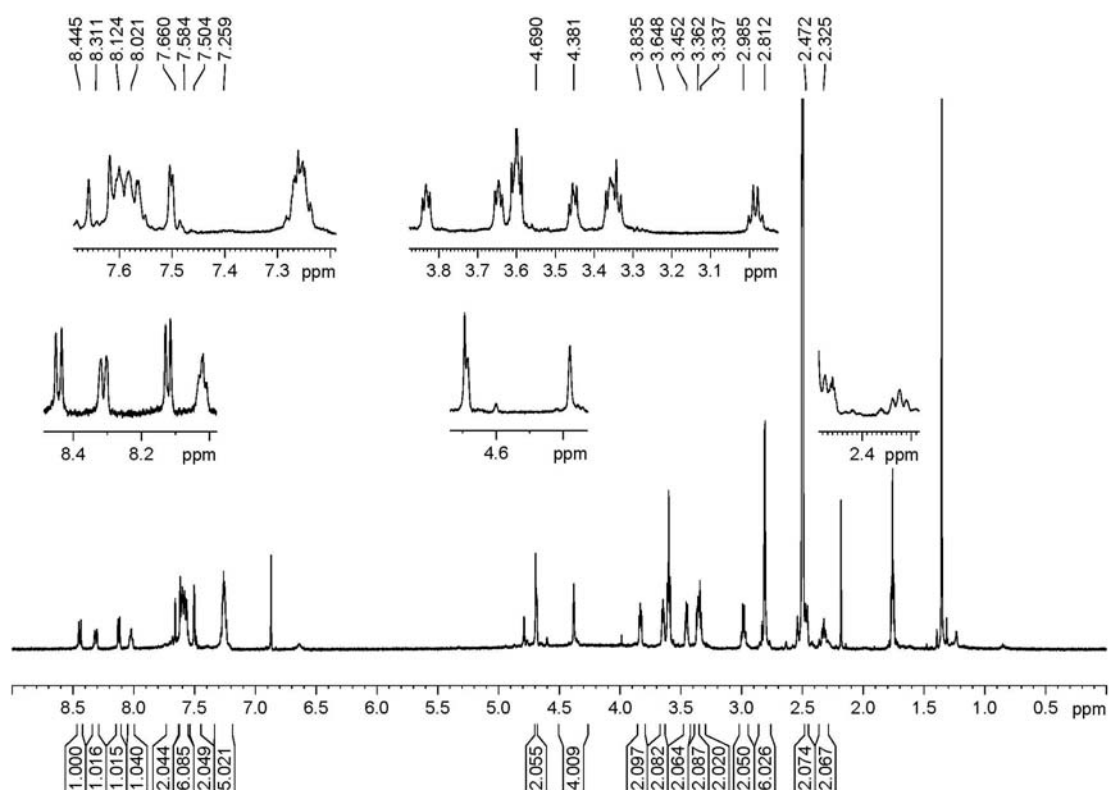
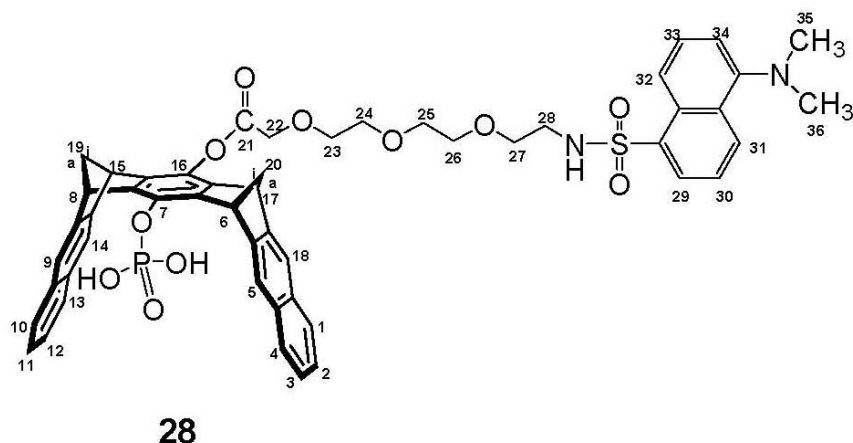
m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$: ber. 1067.3348
gef. 1067.3349

6.6.2.4 Phosphorylierung des monosubstituierten Hydroxy-Clips **26a** zu **28**

**28**

In einem 50 mL-Stickstoffkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 40.0 mg (0.05 mmol) monosubstituierter Hydroxy-Clip **26a** in 30 mL absolutem THF suspendiert. Zu dieser auf 0 °C gekühlten Suspension wurden mittels Einwegspritze 145 mg (86 µL, 0.95 mmol) Phosphoroxychlorid gegeben. Nach 10 Minuten wurden 25.0 mg (35 µL, .25 mmol) Triethylamin dazu getropft. Die Suspension wurde 1 h lang bei 0 °C gerührt. Danach wurde die noch kalte Reaktionsmischung über eine D4-Fritte abfiltriert und das Filtrat im Ölpumpenvakuum bis zur Trockne eingengt. Die Aufarbeitung erfolgte analog 6.4.4.

Ausbeute an **28**: 38 mg (0.04 mmol, 87%); Schmp: 231 °C (Zersetzung)



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 2.33 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.47 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 2.81 (s, 6 H, H-35, H-36), 2.99 (q, 2 H, H-28), 3.34 (t, 2 H, H-27), 3.36 (t, 2 H, H-25), 3.45 (t, 2 H, H-26), 3.65 (t, 2 H, H-23), 3.84 (t, 2 H, H-24), 4.38 (s, 4 H, H-6, H-8, H-15, H-17), 4.69 (s, 2 H, H-22), 7.26 (m, 5 H, H-2, H-3, H-11, H-12, H-31), 7.50 (s, 2 H, H-5, H-9), 7.57, 7.58, 7.61 (m, 6 H, H-1, H-4, H-10, H-13, H-30, H-33), 7.66 (s, 2 H, H-14, H-18), 8.02 (t(br), 1 H, NH), 8.12 (d, 1 H, H-32), 8.31 (d, 1 H, H-29), 8.45 (d, 1 H, H-34)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 42.3 (C-28), 45.1 (C-35, C-36), 47.2 (C-6, C-8, C-15, C-17), 64.7 (C-19, C-20), 67.5 (C-22), 69.1 (C-27), 69.6 (C-25, C-26), 70.8 (C-23), 70.3 (C-24), 115.2 (C-31), 119.6, 120.3 (C-5, C-9, C-14, C-18, C-29, C-33), 125.3, (C-2, C-3, C-11, C-12), 127.4 (C-1, C-4, C-10, C-13, C-30), 128.1 (C-32), 129.1, 129.2 (C-29a, C-32a), 129.3 (C-34), 131.5, 131.6 (C-4a, C-9a, C-13a, C-18a), 136.3 (C-7, C-16, C-31a), 140.6, 140.7 (C-6a, C-7a, C-15a, C-16a), 146.0 (C-5a, C-8a), 146.1 (C-14a, C-17a), 151.5 (C-34a), 168.7 (COO)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -5.46

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3447 (-OH), 3050 (=C-H), 2958, 2936, 2869 (-C-H, -CH₂, -CH₃, N-CH₃), 1773 (-C=O), 1632 (-N-H), 1574 (Ringschwingung), 1469 (-CH₂, -CH₃), 1326 (-C-N, -SO₂-N), 1278 (-C-O-C, -P=O), 1237 (P-O-Aryl), 1141 (-SO₂, -COC), 853 (=C-H), 792, 752 (=C-H, -C-S)

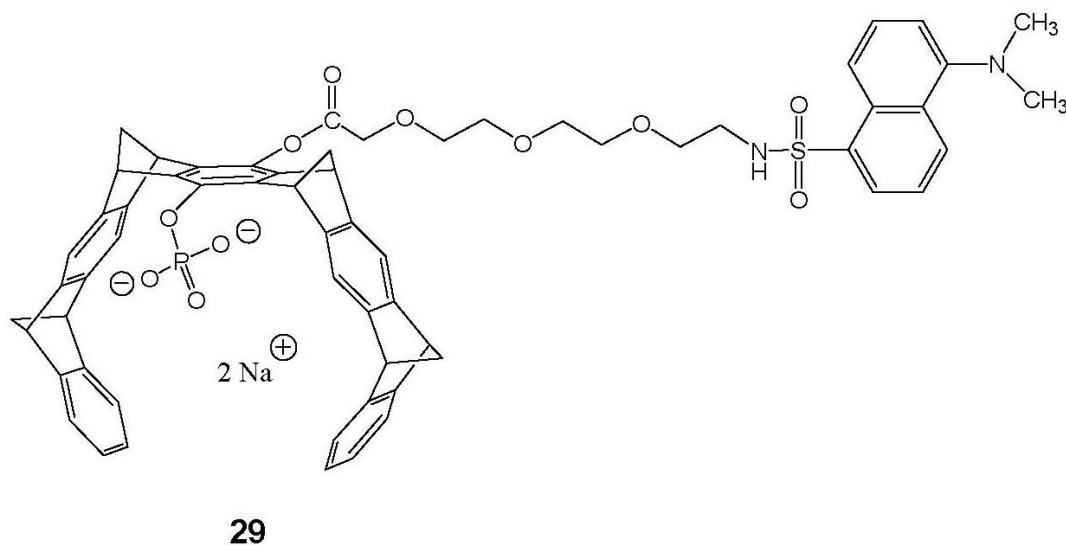
Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{52}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{PS}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 941.2867
gef. 941.2894

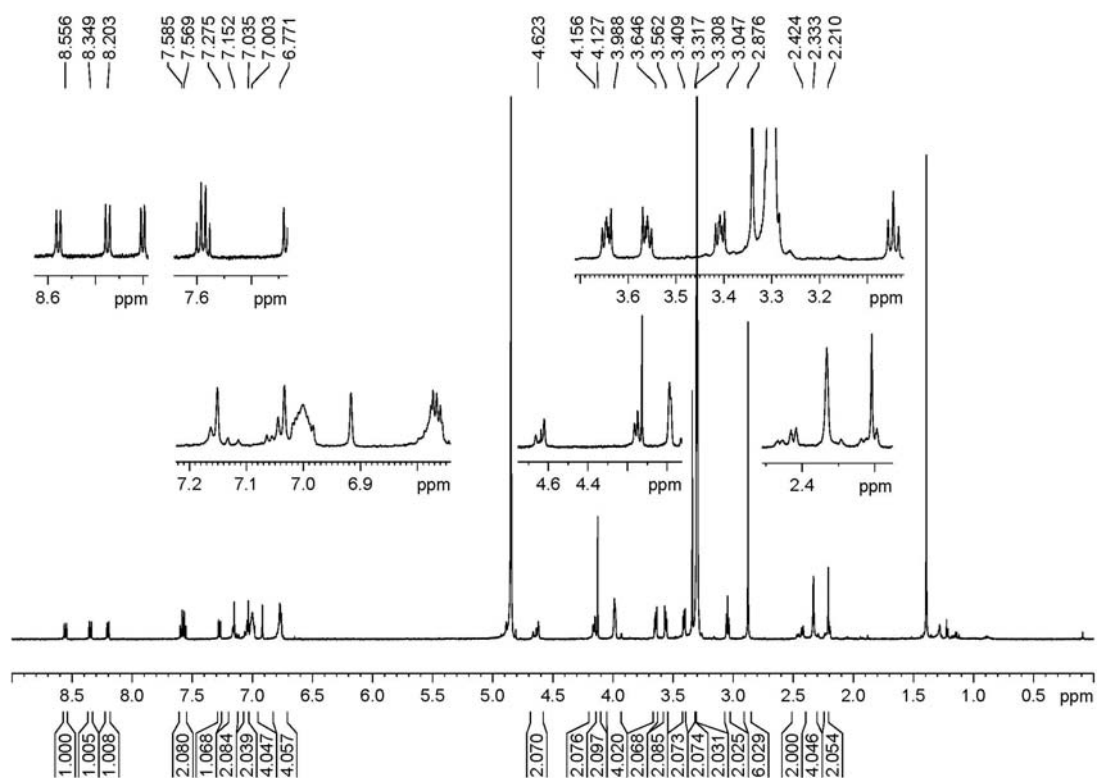
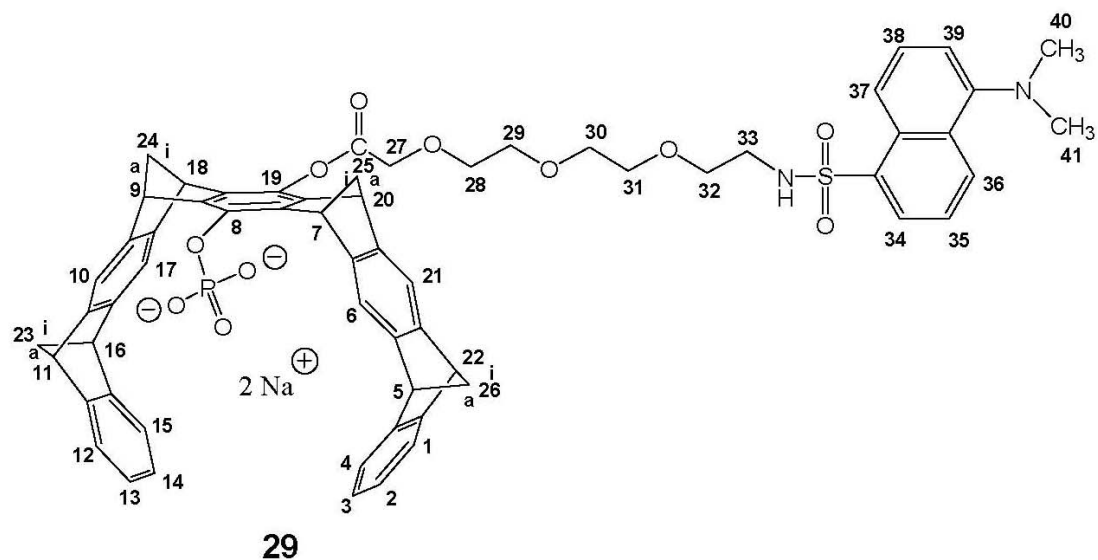
m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 963.2687
gef. 963.2706

m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$: ber. 939.2722
gef. 939.2782

6.6.2.5 Synthese des Bis-Natriumsalzes **29**

In einem 10 mL-Stickstoffkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 38.0 mg (0.02 mmol) Monophosphat-Tweezer **27** in 5 mL Methanol p.a. suspendiert. Zu dieser Suspension wurden bei RT 4.0 mg (0.04 mmol) Natriumhydroxid-Monohydrat gegeben. Nach kurzer Zeit ging die Suspension in eine klare Lösung über. Man ließ die Reaktionsmischung $\frac{1}{2}$ h lang bei RT rühren. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **29**: 39.1 mg (0.02 mmol, quantitativ); Schmp: 275 °C (Zersetzung)



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 2.21 (dt, 2 H, H-24a, H-25a), 2.33 (m, 4 H, H-23i, H-23a, H-26i, H-26a), 2.42 (dt, 2 H, H-24i, H-25i), 2.88 (s, 6 H, H-40, H-41), 3.05 (t, 2 H, H-33), 3.31 (t, 2 H, H-32), 3.32 (t, 2 H, H-30), 3.41 (t, 2 H, H-31), 3.56 (t, 2 H, H-28), 3.65 (t, 2 H, H-29), 3.99 (t(br), 4 H, H-5, H-7, H-9, H-11), 4.13 (s, 2 H, H-27), 4.16 (t(br), 2 H, H-16, H-22), 4.62 (t(br), 2 H, H-18, H-20), 6.77 (dd, 4 H, H-2, H-3, H-13, H-14), 7.00 (dd, 4 H, H-1, H-4, H-12, H-15), 7.04 (s, 2 H, H-6, H-10), 7.15 (s, H-17, H-21), 7.28 (d, 2 H, H-36), 7.57 (t, 2 H, H-38), 7.59 (t, 2 H, H-35), 8.20 (d, 2 H, H-37), 8.35 (d, 2 H, H-34), 8.56 (d, 2 H, H-39)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 44.0 (C-33), 46.0 (C-40,C-41), 48.6 (C-16, C-22), 49.9 (C-18, C-20), 52.6 (C-5, C-7, C-9, C-11), 69.1, 69.3 (C-23, C-24, C-25, C-26, C-27), 70.7 (C-32), 71.2 (C-30), 71.5 (C-31), 71.7 (C-28), 72.0 (C-29), 116.6, 116.8 (C-6, C-10, C-36), 117.7 (C-17, C-21), 120.9 (C-34), 122.1 (C-1, C-4, C-12, C-15), 124.5 (C-38), 126.1 (C-2, C-3, C-13, C-14), 129.3 (C-35), 130.2 (C-37), 131.2 (C-39), 131.4 (C-37a, C-34a), 137.6 (C-36a), 143.0 (C-7a, C-8a, C-8, C-18a, C-19a, C-19), 148.5 (C-6a, C-9a, C-17a, C-20a), 149.9, 150.2 (C-5a, C-10a, C-16a, C-21a), 152.4 (C-4a, C-11a, C-15a, C-22a), 153.4 (C-39a), 169.3 (-COO)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 0.05

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3435 (-NH), 3065 (=C-H), 2958, 2866, 2787 (-C-H, -CH₂, -CH₃, N-CH₃), 1767 (-C=O), 1620 (-N-H), 1588 (Ringschwingung), 1455 (-CH₂, -CH₃), 1319 (-C-N, -SO₂-N), 1275 (-C-O-C, -P=O), 1231 (P-O-Aryl), 1141, 1120 (-SO₂, -COC), 852 (=C-H), 792, 754 (=C-H, -C-S)

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{62}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_{11}\text{PS}$

m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

ber. 1113.3132

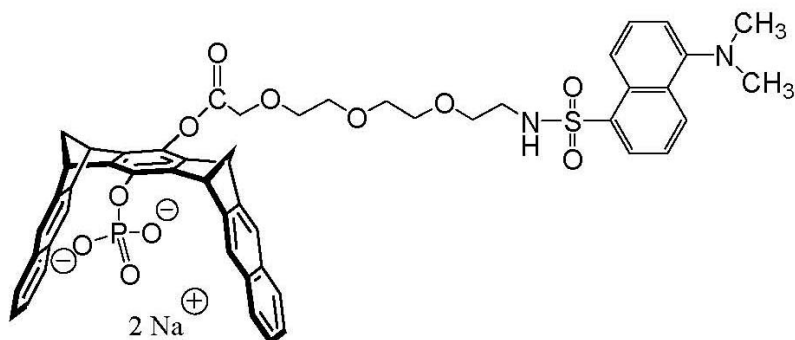
gef. 1113.3146

m/z $[\text{M}+\text{Na}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$:

ber. 1145.3394

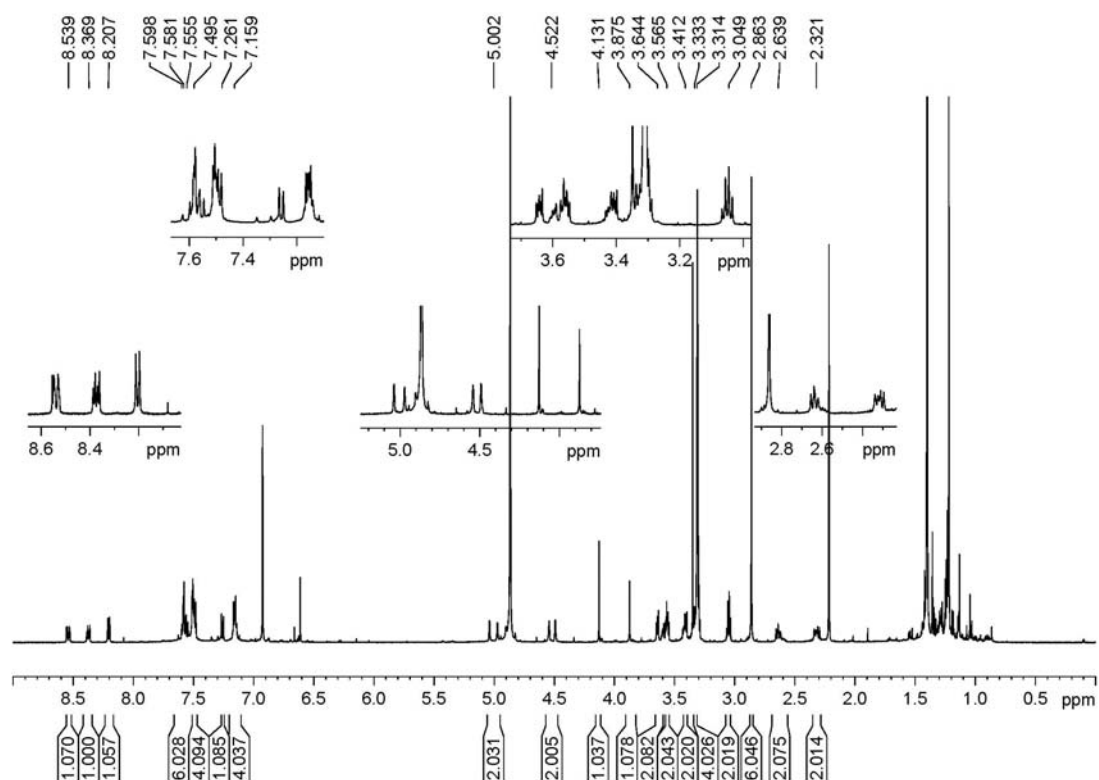
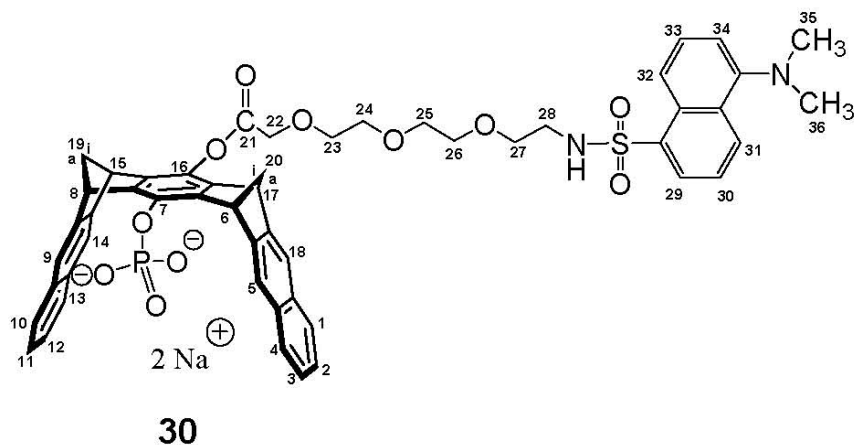
gef. 1145.3386

6.6.2.6 Synthese des Bis-Natriumsalzes **30**

**30**

In einem 10 mL-Stickstoffkolben wurden unter Argon 13.4 mg (0.01 mmol) der Verbindung **28** in 5 mL Methanol p.a. suspendiert. Zu dieser Suspension wurden bei RT 1.6 mg (0.02 mmol) Natriumhydroxid-Monohydrat zugegeben, wobei sich nach kurzer Zeit eine klare Lösung bildete. Nachdem die Reaktionsmischung $\frac{1}{2}$ h lang bei RT rührte, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute an **30**: 14.0 mg (0.01 mmol, quantitativ); Schmp: 234 °C (Zersetzung)



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 2.32 (d, 2 H, H-19a, H-20a), 2.64 (d, 2 H, H-19i, H-20i), 2.86 (s, 6 H, H-35, H-36), 3.05 (q, 2 H, H-28), 3.31 (t, 2 H, H-27), 3.33 (t, 2 H, H-25), 3.41 (t, 2 H, H-26), 3.57 (t, 2 H, H-23), 3.64 (t, 2 H, H-24), 3.88, 4.13 (s, 2 H, H-22), 4.52 (s, 2 H, H-15, H-17), 5.00 (s, 2 H, H-6, H-8), 7.16 (m, 4 H, H-2, H-3, H-11, H-12), 7.26 (d, 1 H, H-31), 7.51 (m, 4 H, H-1, H-4, H-10, H-13), 7.56 (m, 4 H, H-5, H-9, H-14, H-18), 7.58 (d, 1 H, H-33), 7.60 (d, 1 H, H-30), 8.21 (d, 1 H, H-32), 8.37 (d, 1 H, H-29), 8.54 (d, 1 H, H-34)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 44.3 (C-28), 46.0 (C-35, C-36), 48.3 (C-15, C-17), 49.4 (C-6, C-8), 65.4 (C-19, C-20), 69.3 (C-22), 71.0 (C-25, C-27), 71.4 (C-26), 71.6 (C-23), 71.7 (C-24), 116.5 (C-31), 119.6 (C-5, C-9, C-14, C-18), 120.6 (C-33), 121.1 (C-29), 125.7 (C-2, C-3, C-11, C-12), 128.6 (C-1, C-4, C-10, C-13, C-30), 130.1 (C-32), 131.0 (C-34), 131.3, 131.4 (C-29a, C-30a, C-32a), 133.6, 133.7 (C-4a, C-9a, C-13a, C-18a), 142.2 (C-6a, C-7a, C-15a, C-16a, C-7, C-16), 150.3 (C-5a, C-8a, C-14a, C-17a), 153.1 (C-34a), 173.0 (COO)

^{31}P -NMR-Spektrum (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 2.01

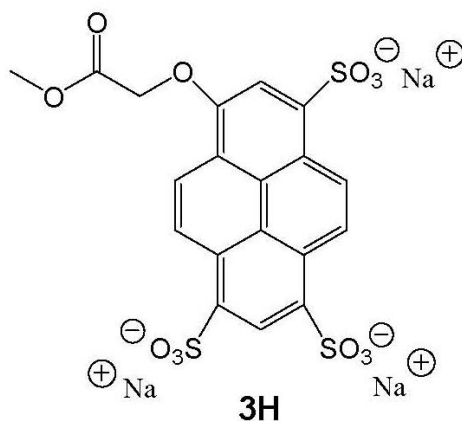
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3434 (-NH), 3055 (=C-H), 2936, 2867, 2787 (-C-H, -CH₂, -CH₃, N-CH₃), 1773 (-C=O), 1612 (-N-H), 1574 (Ringschwingung), 1467 (-CH₂, -CH₃), 1324 (-C-N, -SO₂-N), 1278 (-C-O-C, -P=O), 1237 (P-O-Aryl), 1142, 1118 (-SO₂, -COC), 858 (=C-H), 790, 750 (=C-H, -C-S)

Molmassenfeinbestimmung: $\text{C}_{52}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_{11}\text{PS}$

m/z $[\text{M}+\text{Na}_3+\text{H}_2\text{O}]^+$:	ber. 1025.2431
	gef. 1025.2607

6.6.3 Synthese der Pyren-Fluoreszenzsonde

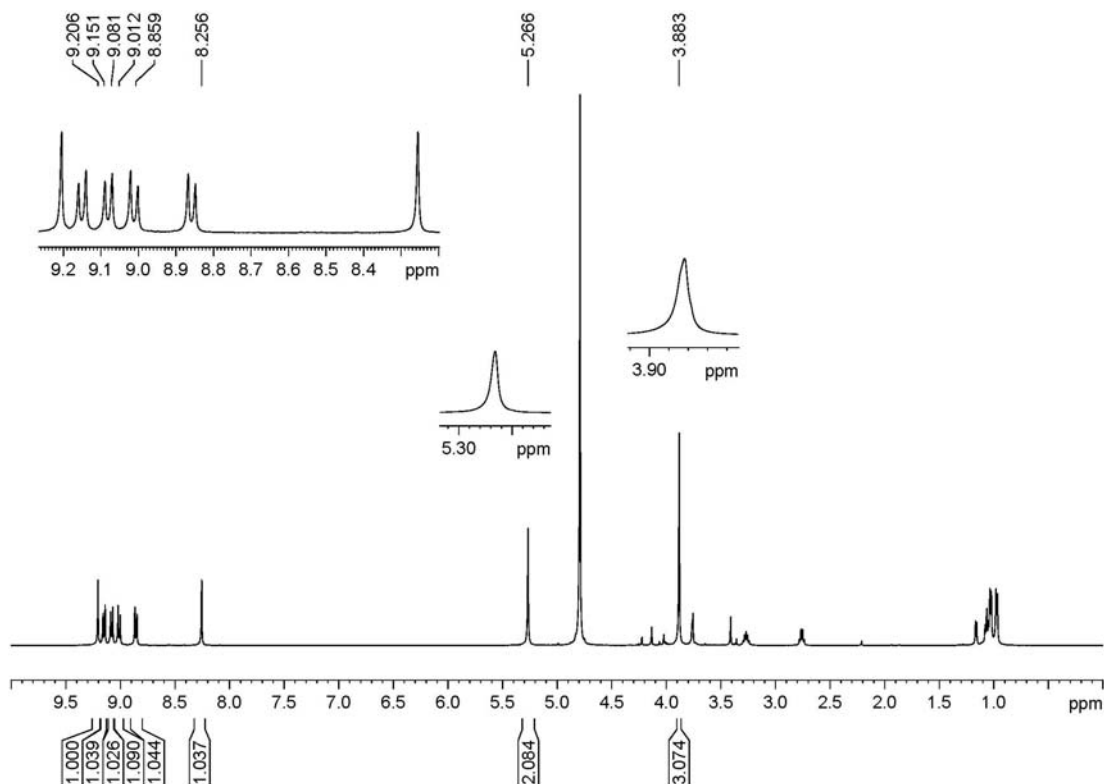
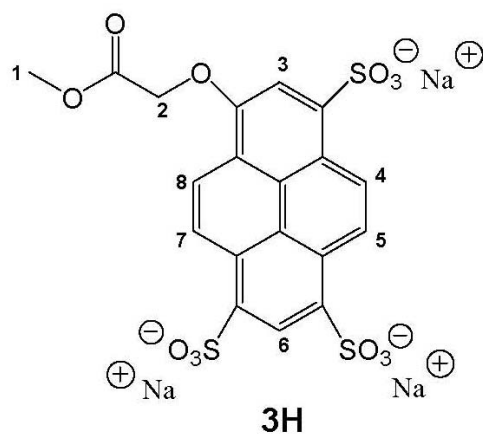
6.6.3.1 Veretherung des HPTS (1H) mit Bromoethylacetat (2H) unter Bildung des Methylesters 3H^[202]



In einem 100 mL-Stickstoffkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss 823.0 mg (1.57 mmol) HPTS (**1H**) in 50 mL Methanol p.a. suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde 5 h lang unter Rückfluss gerührt. Innerhalb dieser Zeit wurden 994.0 mg (657 μ L, 5.95 mmol) Bromessigsäureethylester (**2H**) und 566.0 mg (74 μ L, 4.38 mmol) DIPEA dazugegeben. Nach Zugabe wurde die Reaktionsmischung weitere 3 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt, der Rückstand abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Der Rückstand wurde 30 Minuten lang bei RT in 20 mL Isopropanol gerührt. Zum Schluss wurde der Feststoff über eine D4-Fritte abfiltriert und 48 h lang unter Vakuum über KOH im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute an **3H**: 950.0 mg (1,56 mmol, 99%); Schmp: >300 °C

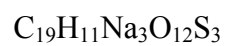
Die spektroskopischen Daten stimmten mit der Literatur überein.



^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 3.88 (s, 3 H, H-1), 5.27 (s, 2 H, H-2), 8.26 (s, 1 H, H-6), 8.86 (d, 1 H, H-5), 9.01 (d, 1 H, H-7), 9.06 (d, 1 H, H-4), 9.15 (d, 1 H, H-8), 9.21 (s, 1 H, H-3)

^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, D_2O): δ [ppm] = 53.1 (C-1), 66.4 (C-2), 110.1 (CH), 121.2, 122.0, 123.5(CH), 124.3(CH), 124.6(CH), 124.9(CH), 125.8, 127.3(CH), 130.2, 138.9, 152.2, 171.8 (COO)

Molmassenfeinbestimmung:



m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 596.9178
gef. 596.9190

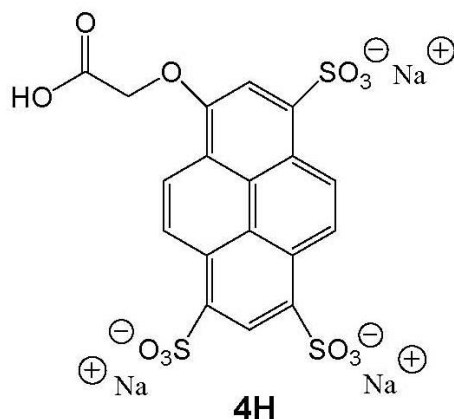
m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 618.8998
gef. 618.9002

m/z $[\text{M}-\text{Na}]^-$: ber. 572.9214
gef. 572.9188

m/z $[\text{M}-2\text{Na}]^-$: ber. 550.9394
gef. 550.9370

m/z $[\text{M}-3\text{Na}]^-$: ber. 528.9575
gef. 528.9546

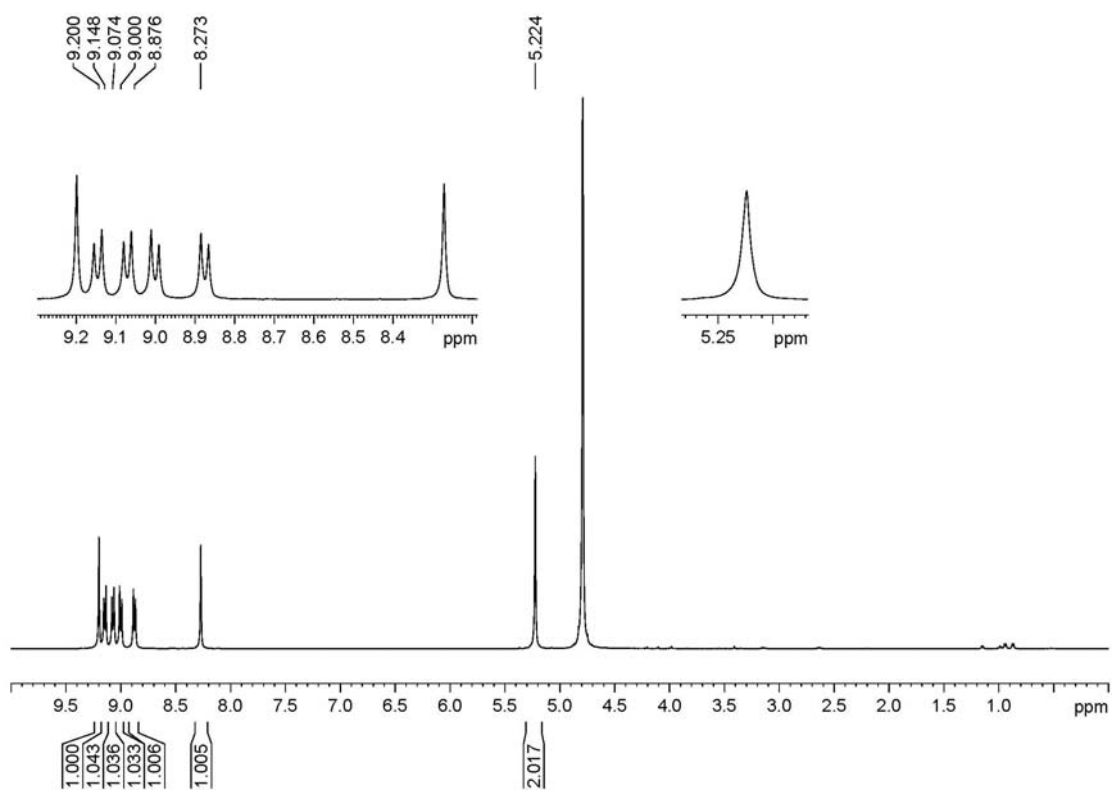
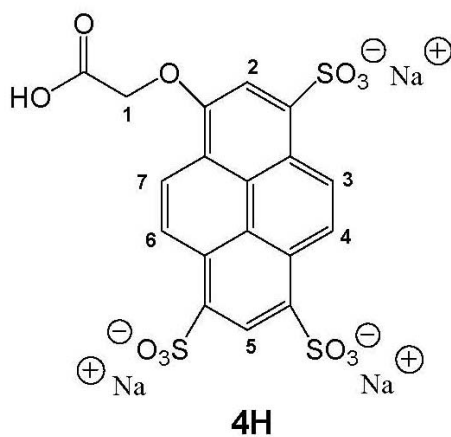
6.6.3.2 Hydrolyse des Methylesters **3H**



In einem 25 mL-Stickstoffkolben wurden 900.0 mg (1.48 mmol) der Verbindung **3H** in 5 mL dest. Wasser gelöst und mit 60.0 mg (1.50 mmol) NaOH versetzt. Die braune Reaktionsmischung wurde 15 Minuten lang bei 60 °C erwärmt. Danach wurde diese auf RT abgekühlt und mit 75 µL konz. HCl versetzt. Kurze Zeit später fiel ein Feststoff aus. Nach Zugabe von 5 mL Isopropanol wurde dieser über eine D4-Fritte abfiltriert und an der Luft getrocknet.

Ausbeute an **4H**: 850.0 mg (1.46mmol, 99%); Schmp: >300 °C

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.

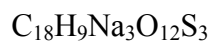


¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 5.22 (s, 2 H, H-1), 8.27 (s, 1 H, H-5), 8.88 (d, 1 H, H-4), 9.00 (d, 1 H, H-6), 9.07 (d, 1 H, H-3), 9.15 (d, 1 H, H-7), 9.20 (s, 1 H, H-2)

¹³C-NMR-Spektrum (125.7 MHz, D₂O): δ [ppm] = 66.7 (C-1), 110.1 (CH), 121.1, 121.9, 123.3 (CH), 124.3 (CH), 124.6 (CH), 124.8 (CH), 125.8, 127.3 (CH), 129.6, 130.2, 134.9, 138.8, 152.4, 173.4 (COO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3466 cm^{-1} (-OH), 1761 (-C=O), 1622, 1604 (-C=O, Ringschwingung), 1500 (Ringschwingung), 1445 (-CH₂), 1413 (-SO₂), 1212 (-C-O-C, -SO₂), 1097, 1058 (-C-O-C)

Molmassenfeinbestimmung:



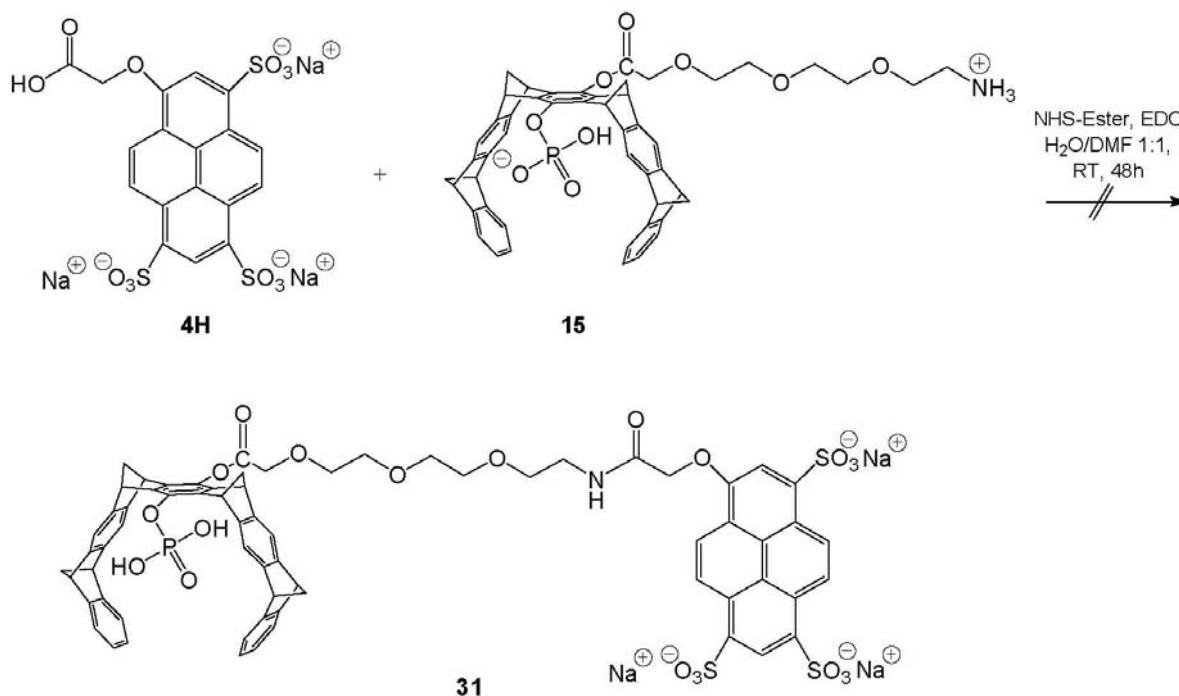
m/z [M+H]⁺: ber. 582.9022
gef. 582.8977

m/z [M+Na]⁺: ber. 604.8841
gef. 604.8861

m/z [M-H]⁻: ber. 580.8876
gef. 580.8837

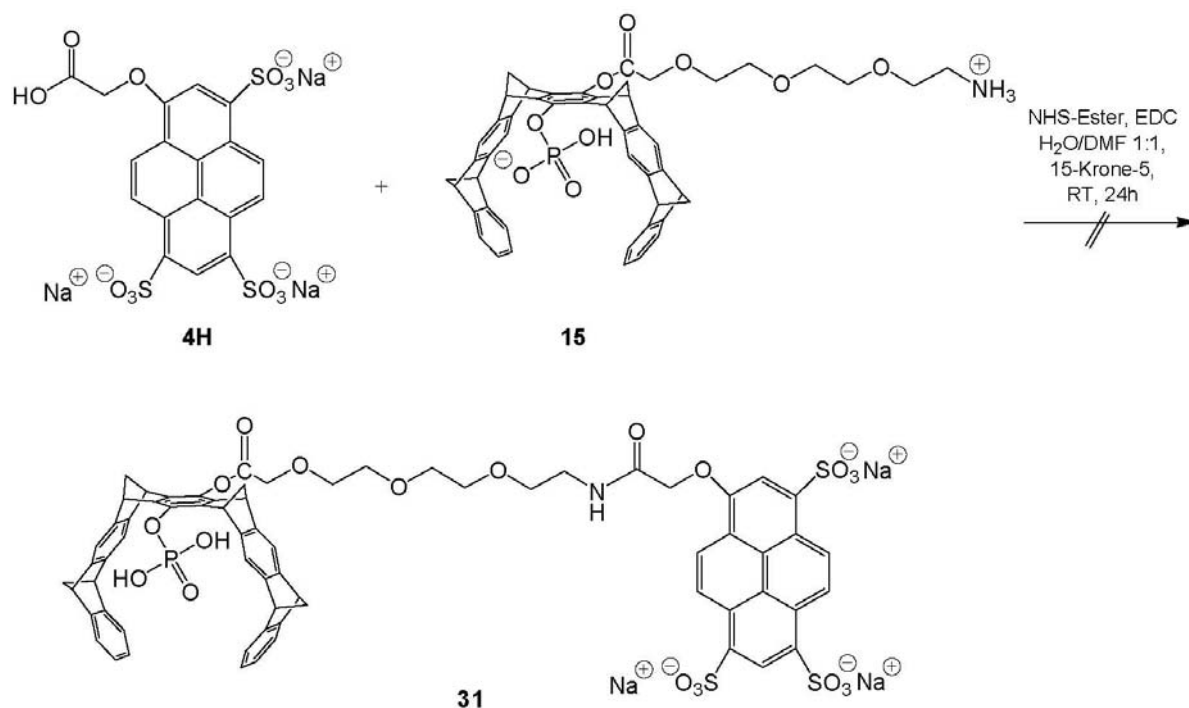
6.6.3.3 Kupplungsversuche der Säure **4H**

6.6.3.3.1 Erster Kupplungsversuch der Säure **4H** mit **15**



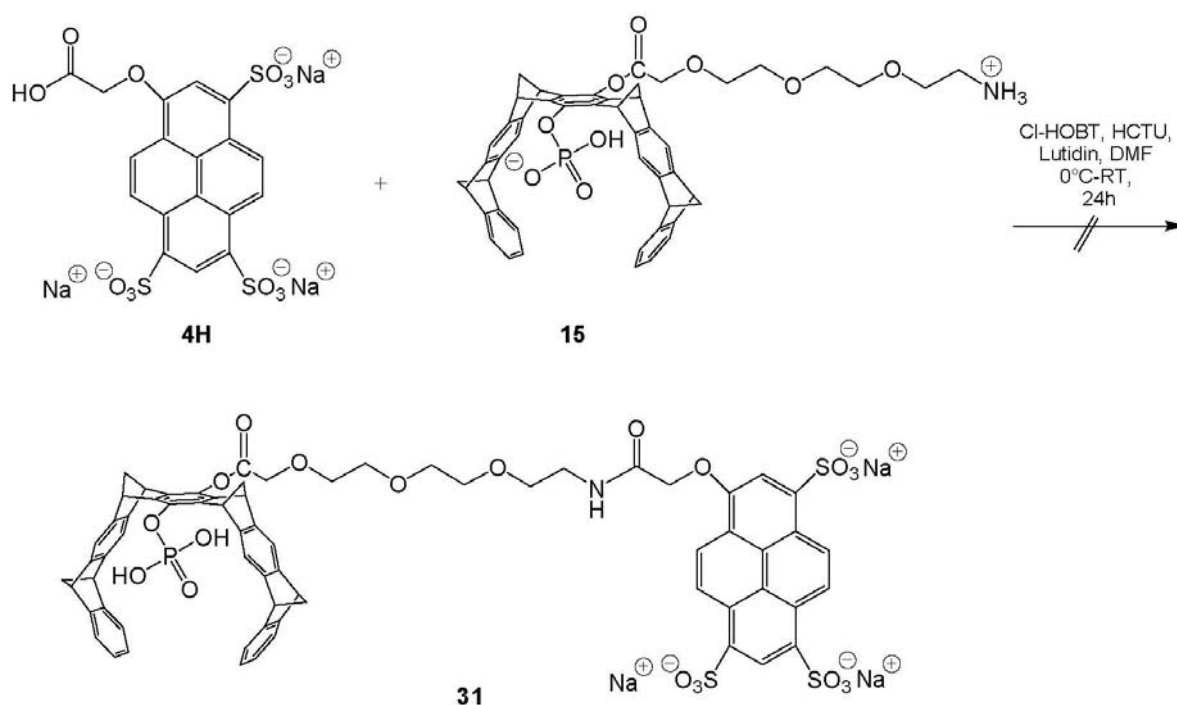
In einem Eppendorfgefäß wurden 1.0 mg (15.0 μmol) Pyrensäure **4H**, 0.7 mg (30.4 μmol) EDC und 0.72 mg (30.4 μmol) NHS-Ester in 70 μL dest. Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden 1.5 mg (15.0 μmol) Tweezer **15** in 50 μL DMF gelöst dazu pipettiert. Dabei fiel die Säure **4H** direkt aus. Die Reaktionsmischung wurde 48 h lang bei RT gerührt. Es fand keine Umsetzung zum gewünschten Amid **31** statt.

6.6.3.2 Zweiter Kupplungsversuch der Säure **4H** mit **15**



In einem 10 mL-Einhalskolben wurden 4.0 mg (6.87 μ mol) der Verbindung **4H**, 4.5 mg (4 μ L, 20.4 μ mol) 15-Krone-5, 2.6 mg (13.6 μ mol) EDC und 1.6 mg (13.9 μ mol) NHS-Ester in 3 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 5.5 mg (6.59 μ mol) Tweezer **15** in 3 mL DMF gelöst dazu pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h lang bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand an der Lyophille getrocknet. Der Feststoff wurde in Dichlormethan aufgeschlämmt, im US-Bad behandelt und abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach wurde der gelbe Feststoff an der Lyophille getrocknet. Es fand keine Umsetzung zum gewünschten Amid **31** statt.

6.6.3.3 Dritter Kupplungsversuch der Säure **4H** mit **15**



In einem 10 mL-Einhalsskolben wurden 4.0 mg (6.87 μmol) Pyrensäure **4H**, 2.8 mg (16.5 μmol) Cl-HOBT, 2.8 mg (6.77 μmol) HCTU und 2.20 mg (2 μL , 20.5 μmol) Lutidin in 3 mL DMF gelöst. Nach 10 minütiger Voraktivierung bei 0 °C wurden zu dieser Lösung 5.5 mg (6.58 μmol) Tweezer **15** in 3 mL DMF gelöst dazu pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h lang bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand an der Lyophille getrocknet. Der Feststoff wurde danach in Dichlormethan aufgeschlämmt, im US-Bad behandelt und abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach wurde der Feststoff an der Lyophille getrocknet. Es fand keine Umsetzung zum gewünschten Amid **31** statt.

6.7 Fluoreszenztitrationen

6.7.1 Fluoreszenztitrationen der beiden Tweezers 734 und 750 mit verschiedenen Lysin- und Arginin-Derivaten, sowie mit NAD^+ und NMNA

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und Ac-Lys-OMe in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 750	Ac-Lys-OMe · AcOH
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.18 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.374 ($1.56 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10	0.65
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$

Tweezer **750** wurde in 10 mL Puffer gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 700 μL in der Küvette vorgelegt. Ac-Lys-OMe wurde in 650 μL Stammlösung gelöst und sukzessive in dreizehn Titrationsschritten zu 700 μL der Stammlösung des Tweezers **750** titriert. Nach jedem Titrationsschritt wurde ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen.

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[Ac-Lys-OMe] [mol/L]	[AcLysOMe]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	41.6	0.0	0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.39 \cdot 10^{-5}$	1.55	37.1	4.5	4.3
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.70 \cdot 10^{-5}$	3.06	36.1	5.5	5.8
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.91 \cdot 10^{-5}$	4.53	35.3	6.3	6.4
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.96	34.8	6.8	6.7
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.71	34.6	7.0	7.0
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	11.31	34.5	7.2	7.2
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.01 \cdot 10^{-4}$	13.79	34.4	7.2	7.3
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.53 \cdot 10^{-4}$	16.14	34.2	7.4	7.4
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.25 \cdot 10^{-4}$	19.46	34.1	7.5	7.4
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.93 \cdot 10^{-4}$	22.56	34.2	7.5	7.5
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.76 \cdot 10^{-4}$	26.37	34.2	7.5	7.5
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-4}$	29.87	34.1	7.5	7.5
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.23 \cdot 10^{-4}$	33.09	33.9	7.7	7.6

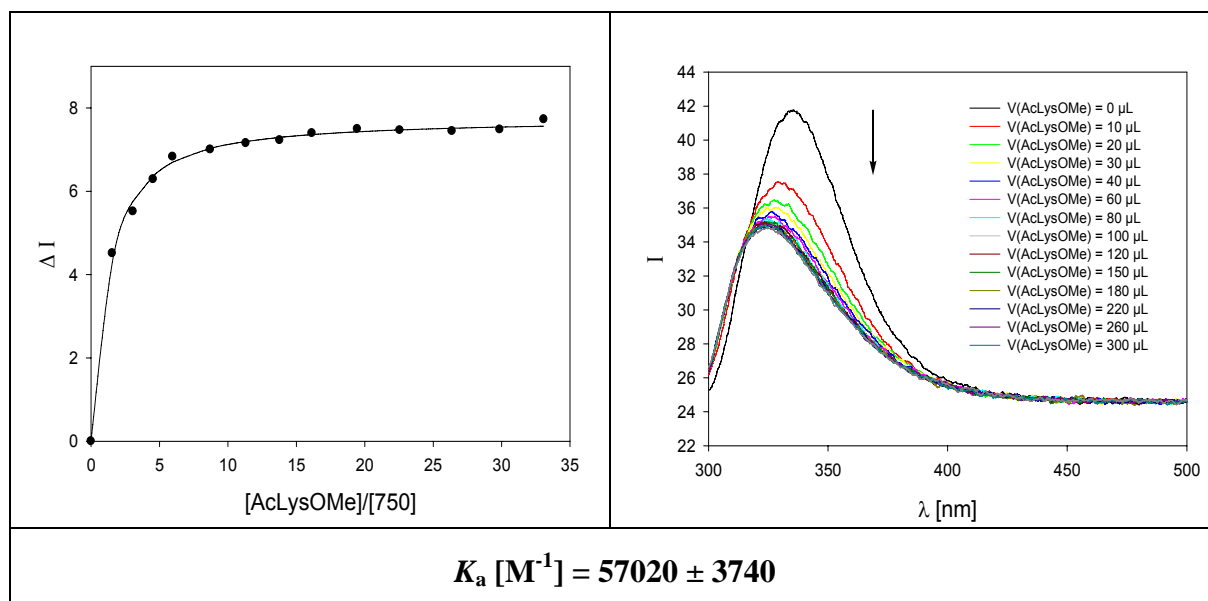


Abbildung 6.1: Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und Tweezer **750** in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Ac-Lys-OMe erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Ac-Lys-OMe in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer **734** und Ac-Lys-OMe in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 734	Ac-Lys-OMe · AcOH
Einwaage [mg]:	0.165 ($2.25 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.38 ($1.59 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.277	0.66
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$

V _{Gast} [μL]	V _{gesamt} [μL]	[734] [mol/L]	[AcLysOMe] [mol/L]	[Ac-Lys-OMe]/ [734]	I 336 nm	Δ I _{obs}	Δ I _{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	53.7	0.0	0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.40 \cdot 10^{-5}$	1.55	50.9	2.8	3.1
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.70 \cdot 10^{-5}$	3.07	49.1	4.6	4.8
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.91 \cdot 10^{-5}$	4.54	47.9	5.9	5.9
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.97	46.9	6.8	6.7
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.71	46.0	7.7	7.6
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	11.32	45.3	8.4	8.2
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.01 \cdot 10^{-4}$	13.79	44.9	8.8	8.5
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.53 \cdot 10^{-4}$	16.15	44.7	9.0	8.8
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.26 \cdot 10^{-4}$	19.47	44.8	8.9	9.1
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.93 \cdot 10^{-4}$	22.57	44.6	9.1	9.2
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.77 \cdot 10^{-4}$	26.39	44.4	9.4	9.4
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-4}$	29.89	44.3	9.4	9.5
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.24 \cdot 10^{-4}$	33.11	44.3	9.5	9.6

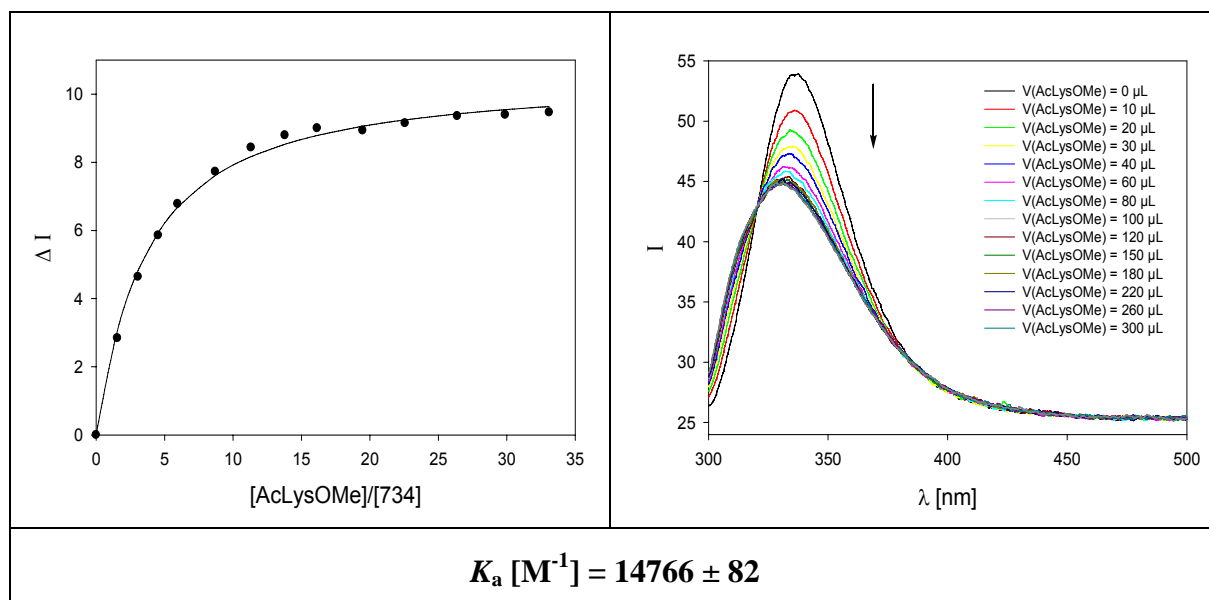


Abbildung 6.2: Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und Tweezer **734** in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragen der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Ac-Lys-OMe erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **734** bei Titration mit Ac-Lys-OMe in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und H-Lys-OH in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 750	H-Lys-OH · HCl
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.18 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.213 ($1.55 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]: =	10	0.6
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.2 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[HLysOH] [mol/L]	[HLysOH]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	41.3	0.0	0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.43 \cdot 10^{-5}$	1.57	37.9	3.3	3.2
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.77 \cdot 10^{-5}$	3.10	36.9	4.4	4.4
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	4.58	36.3	5.0	4.9
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.32 \cdot 10^{-4}$	6.02	36.0	5.2	5.3
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.92 \cdot 10^{-4}$	8.80	35.8	5.5	5.6
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.50 \cdot 10^{-4}$	11.43	35.6	5.7	5.7
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.04 \cdot 10^{-4}$	13.93	35.4	5.9	5.8
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.56 \cdot 10^{-4}$	16.31	35.4	5.9	5.9
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.30 \cdot 10^{-4}$	19.67	35.3	6.0	5.9
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.98 \cdot 10^{-4}$	22.80	35.3	5.9	5.9
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.82 \cdot 10^{-4}$	26.65	35.3	5.9	6.0
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.60 \cdot 10^{-4}$	30.18	35.3	6.0	6.1
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.31 \cdot 10^{-4}$	33.43	35.1	6.2	6.1

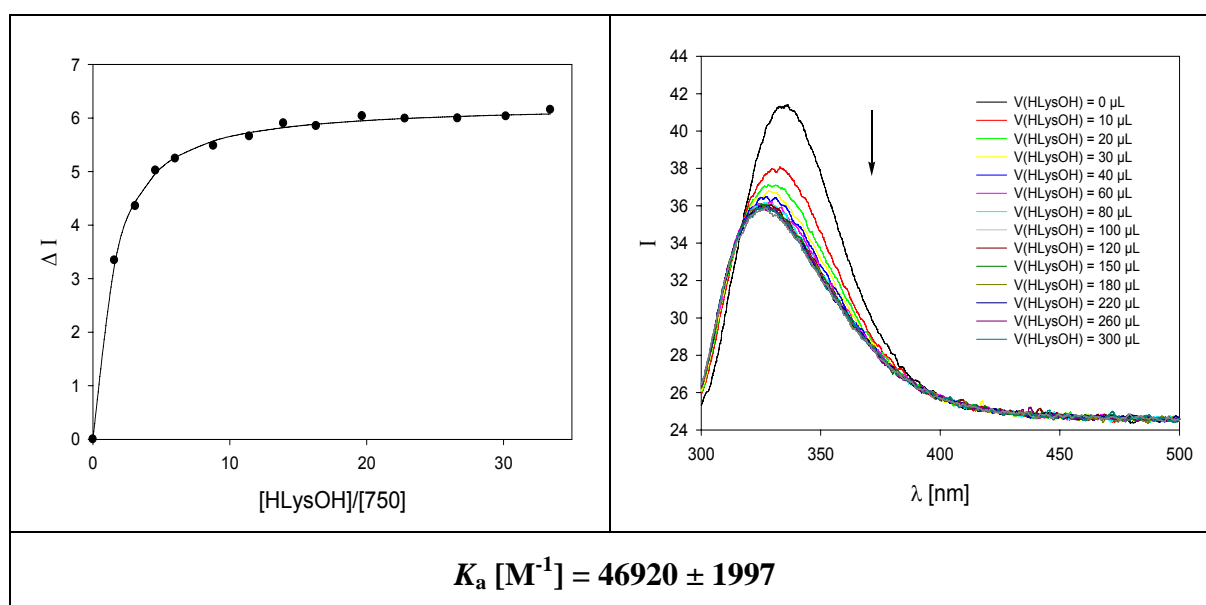


Abbildung 6.3: Fluoreszenztitration zwischen H-Lys-OH und Tweezer **750** in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an H-Lys-OH erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit H-Lys-OH in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer **734** und H-Lys-OH · HCl in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 734	H-Lys-OH · HCl
Einwaage [mg]:	0.165 ($2.24 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.314 ($1.71 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.277	0.71
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$

$V_{\text{Gast}} [\mu\text{L}]$	$V_{\text{gesamt}} [\mu\text{L}]$	[734] [mol/L]	[HLysOH] [mol/L]	[HLysOH]/ [734]	I 336 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	54.0	0	0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.41 \cdot 10^{-5}$	1.56	53.6	0.4	0.5
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.72 \cdot 10^{-5}$	3.08	52.9	1.0	0.9
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.95 \cdot 10^{-5}$	4.55	52.7	1.3	1.3
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.31 \cdot 10^{-4}$	5.99	52.4	1.6	1.6
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.91 \cdot 10^{-4}$	8.74	51.6	2.4	2.2
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.48 \cdot 10^{-4}$	11.36	51.3	2.7	2.8
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.03 \cdot 10^{-4}$	13.84	51.0	2.9	3.2
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.54 \cdot 10^{-4}$	16.21	50.6	3.4	3.6
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.27 \cdot 10^{-4}$	19.54	49.8	4.2	4.1
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.95 \cdot 10^{-4}$	22.65	49.4	4.7	4.5
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.79 \cdot 10^{-4}$	26.48	49.1	4.9	4.9
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.56 \cdot 10^{-4}$	29.99	48.4	5.6	5.4
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.26 \cdot 10^{-4}$	33.23	48.5	5.5	5.7

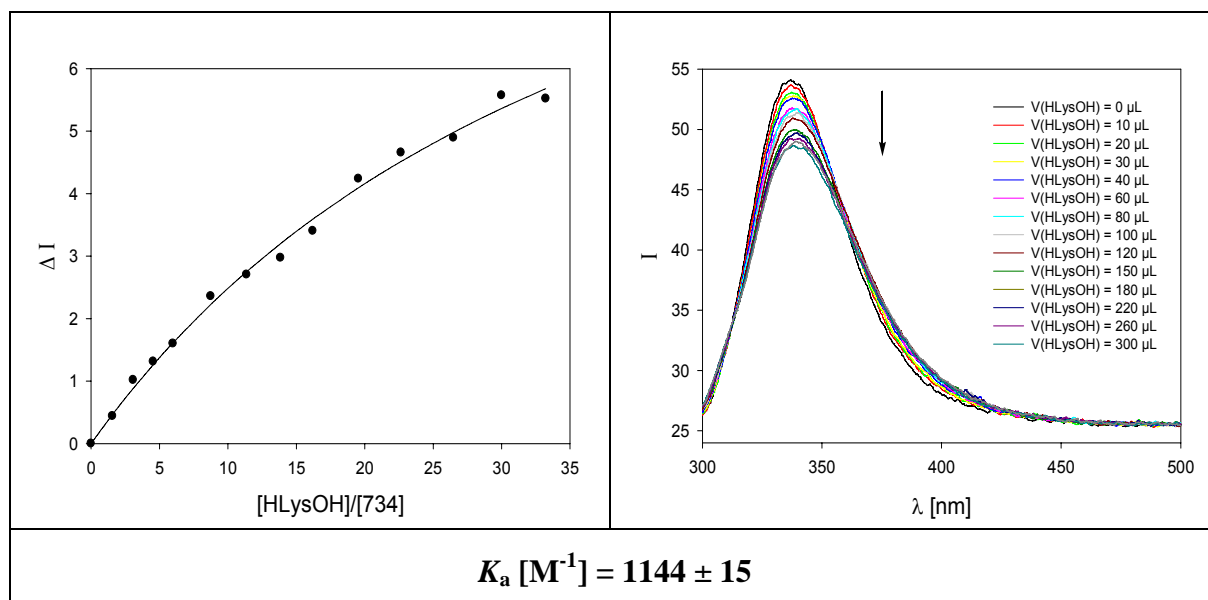


Abbildung 6.4: Fluoreszenztitration zwischen H-Lys-OH und Tweezer **734** in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an H-Lys-OH erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **734** bei Titration mit H-Lys-OH in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und KAA in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 750	KAA
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.18 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.347 ($1.2 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10	0.5
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[KAA] [mol/L]	[KAA]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	41.6	0.0	0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.39 \cdot 10^{-5}$	1.55	38.1	3.4	3.4
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.69 \cdot 10^{-5}$	3.06	36.7	4.9	4.8
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.89 \cdot 10^{-5}$	4.53	36.1	5.5	5.5
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.95	35.6	5.9	5.9
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.69	35.3	6.3	6.4
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	11.29	34.8	6.7	6.7
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.01 \cdot 10^{-4}$	13.77	34.9	6.7	6.8
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.52 \cdot 10^{-4}$	16.12	34.6	7.0	6.9
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.25 \cdot 10^{-4}$	19.43	34.6	6.9	7.0
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.92 \cdot 10^{-4}$	22.53	34.4	7.1	7.1
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.76 \cdot 10^{-4}$	26.33	34.4	7.2	7.2
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.52 \cdot 10^{-4}$	29.82	34.3	7.2	7.2
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.22 \cdot 10^{-4}$	33.04	34.3	7.3	7.2

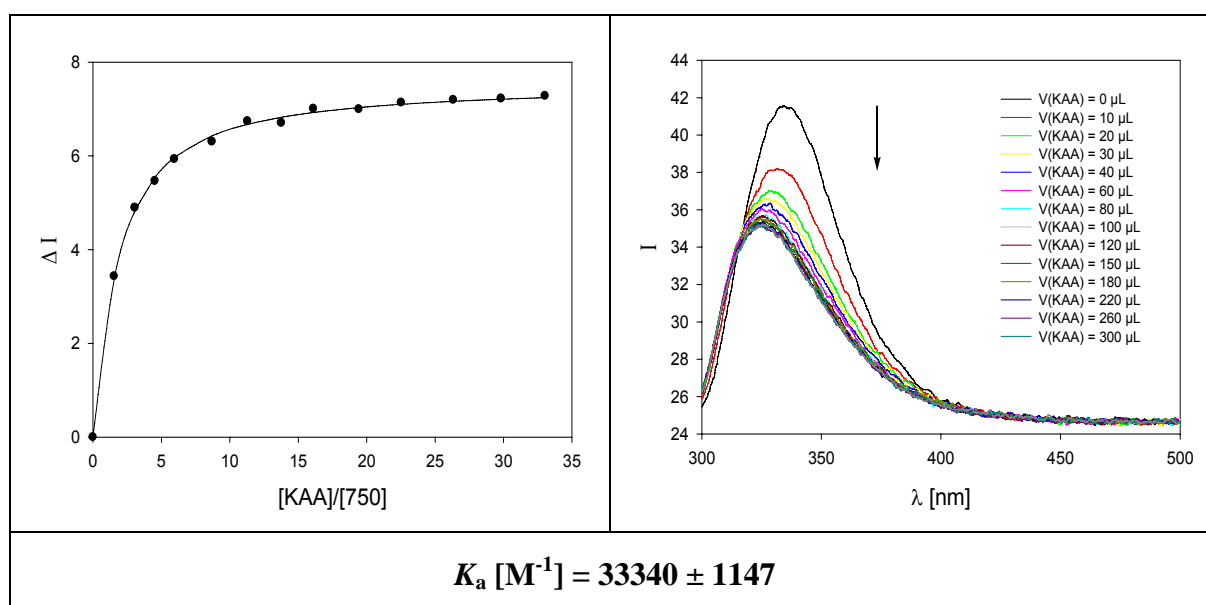


Abbildung 6.5: Fluoreszenztitration zwischen KAA und Tweezer **750** in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an KAA erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit KAA in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 734 und KAA in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 734	KAA
Einwaage [mg]:	0.165 ($2.24 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.360 ($1.24 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.277	0.52
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[734] [mol/L]	[KAA] [mol/L]	[KAA]/ [734]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	52.9	0.0	0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.38 \cdot 10^{-5}$	1.55	52.4	0.5	0.4
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.67 \cdot 10^{-5}$	3.05	51.9	0.9	0.8
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.87 \cdot 10^{-5}$	4.51	51.9	0.9	1.1
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.94	51.5	1.4	1.4
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.67	51.0	1.9	2.0
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.46 \cdot 10^{-4}$	11.27	50.4	2.5	2.5
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.00 \cdot 10^{-4}$	13.73	49.9	2.9	2.9
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.51 \cdot 10^{-4}$	16.08	49.6	3.3	3.3
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.24 \cdot 10^{-4}$	19.38	49.2	3.7	3.7
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.91 \cdot 10^{-4}$	22.47	48.9	4.0	4.1
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.74 \cdot 10^{-4}$	26.27	48.3	4.6	4.5
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.50 \cdot 10^{-4}$	29.75	48.0	4.9	4.9
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.20 \cdot 10^{-4}$	32.95	47.7	5.2	5.2

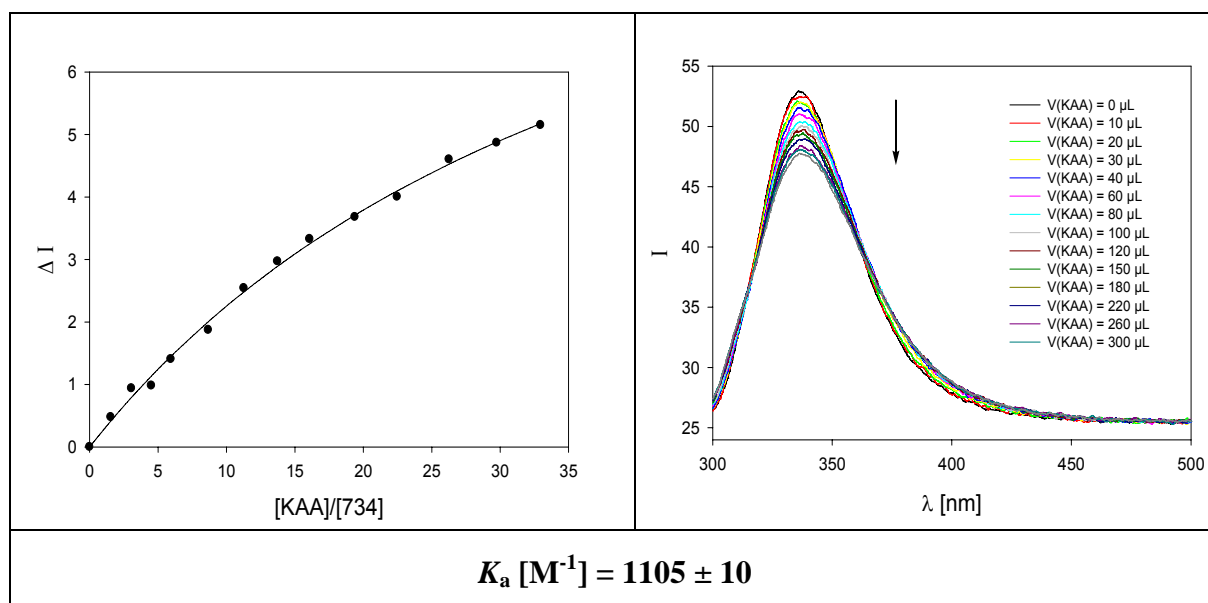


Abbildung 6.6: Fluoreszenztitration zwischen KAA und Tweezer **734** in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an KAA erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplextstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **734** bei Titration mit KAA in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und KKL VFF in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 750	KKLVFF
Einwaage [mg]:	0.172 ($2.29 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.26 ($3.32 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.487	0.45
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$8.3 \cdot 10^{-4}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[KKLVFF] [mol/L]	[KKLVFF]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	43.3	0	0
5	705	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.89 \cdot 10^{-6}$	0.27	41.9	1.4	1.5
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.17 \cdot 10^{-5}$	0.54	40.4	2.9	2.8
15	715	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.74 \cdot 10^{-5}$	0.80	39.3	4.0	3.9
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.31 \cdot 10^{-5}$	1.06	38.5	4.8	4.7
25	725	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.86 \cdot 10^{-5}$	1.31	38.1	5.2	5.2
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.41 \cdot 10^{-5}$	1.56	37.8	5.5	5.6
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.49 \cdot 10^{-5}$	2.05	37.3	6.0	5.9
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.56 \cdot 10^{-5}$	3.00	37.3	6.0	6.3
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.52 \cdot 10^{-5}$	3.90	36.9	6.4	6.4
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.04 \cdot 10^{-4}$	4.75	36.9	6.4	6.5
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.22 \cdot 10^{-4}$	5.56	36.9	6.3	6.6
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.47 \cdot 10^{-4}$	6.70	36.7	6.6	6.6
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.70 \cdot 10^{-4}$	7.77	36.6	6.7	6.6
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.99 \cdot 10^{-4}$	9.08	36.5	6.8	6.7
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.25 \cdot 10^{-4}$	10.29	36.5	6.8	6.7
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.49 \cdot 10^{-4}$	11.40	36.5	6.8	6.7

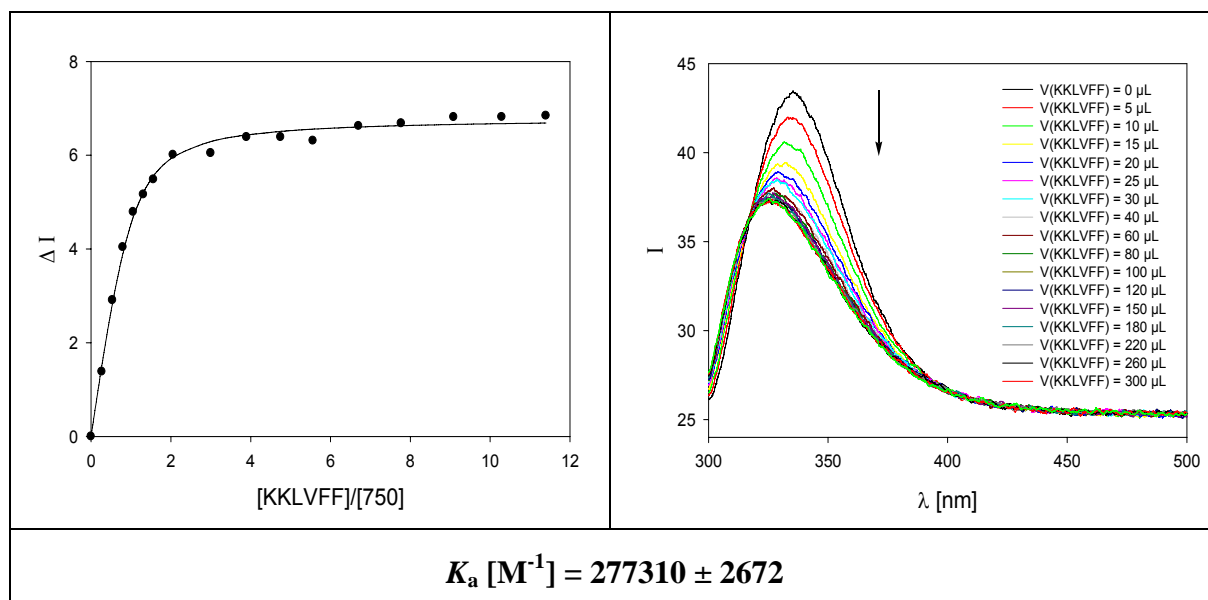


Abbildung 6.7: Fluoreszenztitration zwischen KKL VFF und Tweezer 750 in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an KKL VFF erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers 750 bei Titration mit KKL VFF in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 734 und KKL VFF in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 734	KKLVFF
Einwaage [mg]:	0.165 ($2.24 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.497 ($6.34 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.277	0.765
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$8.0 \cdot 10^{-3}$

V _{Gast} [μL]	V _{gesamt} [μL]	[734] [mol/L]	[KKLVFF] [mol/L]	[KKLVFF]/ [734]	I 336 nm	Δ I _{obs}	Δ I _{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	53.7	0	0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.17 \cdot 10^{-5}$	0.53	52.3	1.3	1.2
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.31 \cdot 10^{-5}$	1.05	51.3	2.4	2.2
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.41 \cdot 10^{-5}$	1.56	50.7	2.9	2.9
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.49 \cdot 10^{-5}$	2.05	49.9	3.7	3.6
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.55 \cdot 10^{-5}$	3.00	49.1	4.6	4.6
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.51 \cdot 10^{-5}$	3.89	48.4	5.2	5.4
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.04 \cdot 10^{-4}$	4.75	47.8	5.9	5.9
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.21 \cdot 10^{-4}$	5.56	47.4	6.3	6.4
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.46 \cdot 10^{-4}$	6.70	46.8	6.9	6.9
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.70 \cdot 10^{-4}$	7.77	46.3	7.3	7.2
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.98 \cdot 10^{-4}$	9.08	45.9	7.7	7.6
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.25 \cdot 10^{-4}$	10.28	45.7	7.9	7.9
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.49 \cdot 10^{-4}$	11.39	45.7	7.9	8.1

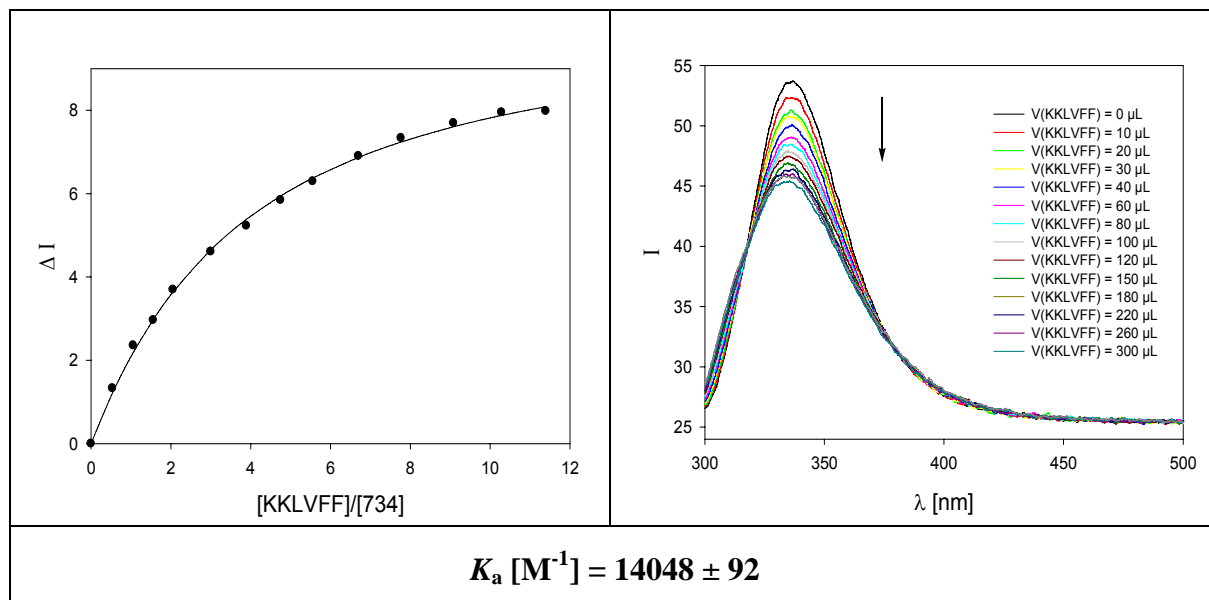


Abbildung 6.8: Fluoreszenztitration zwischen KKL VFF und Tweezer 734 in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an KKL VFF erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers 734 bei Titration mit KKL VFF in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und KKLVFFAK in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 750	KKLVFFAK
Einwaage [mg]:	0.172 ($2.29 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.394 ($4.00 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.487	0.48
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$8.3 \cdot 10^{-4}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[KKLVFFAK] [mol/L]	[KKLVFFAK]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0.00	0.00	43.8	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.17 \cdot 10^{-5}$	0.54	40.1	3.7	3.3
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.32 \cdot 10^{-5}$	1.06	38.1	5.6	5.5
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.43 \cdot 10^{-5}$	1.57	37.1	6.7	6.7
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.51 \cdot 10^{-5}$	2.06	36.5	7.3	7.4
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.58 \cdot 10^{-5}$	3.01	36.2	7.6	8.1
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.55 \cdot 10^{-5}$	3.91	35.9	7.9	8.4
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.04 \cdot 10^{-4}$	4.77	35.6	8.2	8.6
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.22 \cdot 10^{-4}$	5.58	35.3	8.5	8.7
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.47 \cdot 10^{-4}$	6.73	35.1	8.7	8.8
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.70 \cdot 10^{-4}$	7.80	34.7	9.1	8.9
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.99 \cdot 10^{-4}$	9.12	34.5	9.3	8.9
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.26 \cdot 10^{-4}$	10.33	34.3	9.5	9.0
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.50 \cdot 10^{-4}$	11.44	34.2	9.6	9.1

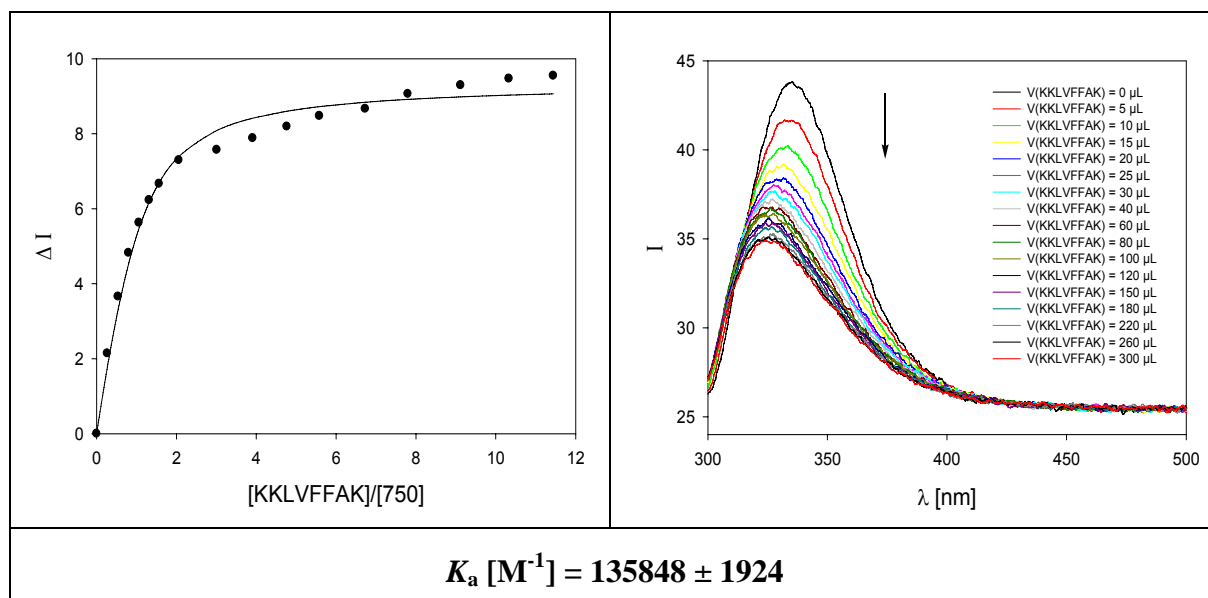


Abbildung 6.9: Fluoreszenztitration zwischen KKLVFFAK und Tweezer 750 in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an KKLVFFAK erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers 750 bei Titration mit KKLVFFAK in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und KLVFF in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 750	KLVFF
Einwaage [mg]:	0.172 ($2.29 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.217 ($3.32 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.487	0.4
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$8.3 \cdot 10^{-4}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[KLVFF] [mol/L]	[KLVFF]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0.00	0.00	43.3	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.17 \cdot 10^{-5}$	0.54	41.3	2.0	1.9
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.31 \cdot 10^{-5}$	1.06	40.1	3.2	3.3
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.42 \cdot 10^{-5}$	1.56	39.2	4.1	4.2
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.49 \cdot 10^{-5}$	2.06	38.3	4.9	4.8
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.56 \cdot 10^{-5}$	3.00	37.6	5.7	5.7
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.52 \cdot 10^{-5}$	3.90	37.4	5.9	6.1
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.04 \cdot 10^{-4}$	4.75	36.9	6.4	6.4
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.22 \cdot 10^{-4}$	5.56	36.7	6.6	6.6
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.47 \cdot 10^{-4}$	6.71	36.4	6.6	6.8
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.70 \cdot 10^{-4}$	7.78	36.3	6.9	6.9
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.99 \cdot 10^{-4}$	9.09	36.3	6.9	7.1
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.25 \cdot 10^{-4}$	10.30	35.9	7.4	7.2
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.49 \cdot 10^{-4}$	11.41	35.9	7.4	7.3

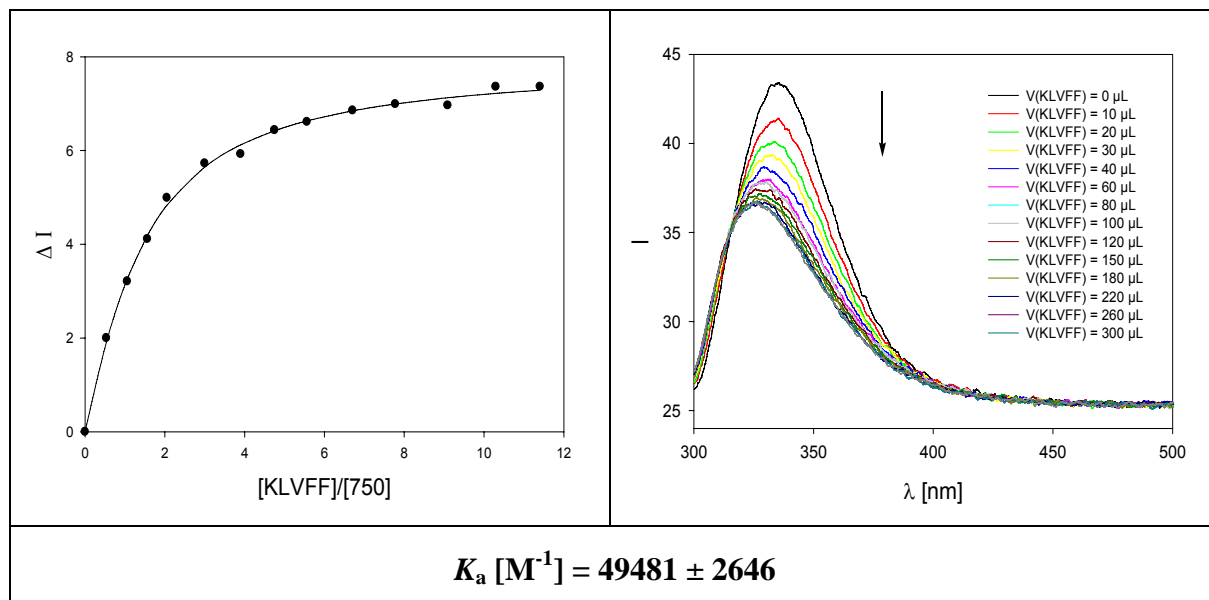


Abbildung 6.10: Fluoreszenztitration zwischen KLVFF und Tweezer **750** in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an KLVFF erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit KLVFF in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und H-KKKK-OH in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 750	H-KKKK-OH
Einwaage [mg]:	0.172 ($2.29 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.26 ($4.89 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.487	0.45
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$1.2 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[KKKK] [mol/L]	[KKKK]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0.00	0.00	42.0	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.73 \cdot 10^{-5}$	0.79	38.3	3.7	3.5
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.40 \cdot 10^{-5}$	1.56	36.8	5.2	5.3
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.03 \cdot 10^{-5}$	2.30	35.8	6.2	6.1
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.83 \cdot 10^{-5}$	2.67	35.6	6.5	6.4
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.62 \cdot 10^{-5}$	3.03	35.5	6.5	6.6
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.67 \cdot 10^{-5}$	4.42	35.1	6.9	7.1
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.26 \cdot 10^{-4}$	5.75	34.8	7.3	7.3
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.53 \cdot 10^{-4}$	7.00	34.7	7.3	7.5
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.79 \cdot 10^{-4}$	8.20	34.8	7.3	7.5
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.16 \cdot 10^{-4}$	9.89	34.6	7.4	7.6
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.51 \cdot 10^{-4}$	11.46	34.3	7.8	7.7
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.93 \cdot 10^{-4}$	13.40	34.2	7.8	7.7
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.32 \cdot 10^{-4}$	15.18	34.1	7.9	7.8

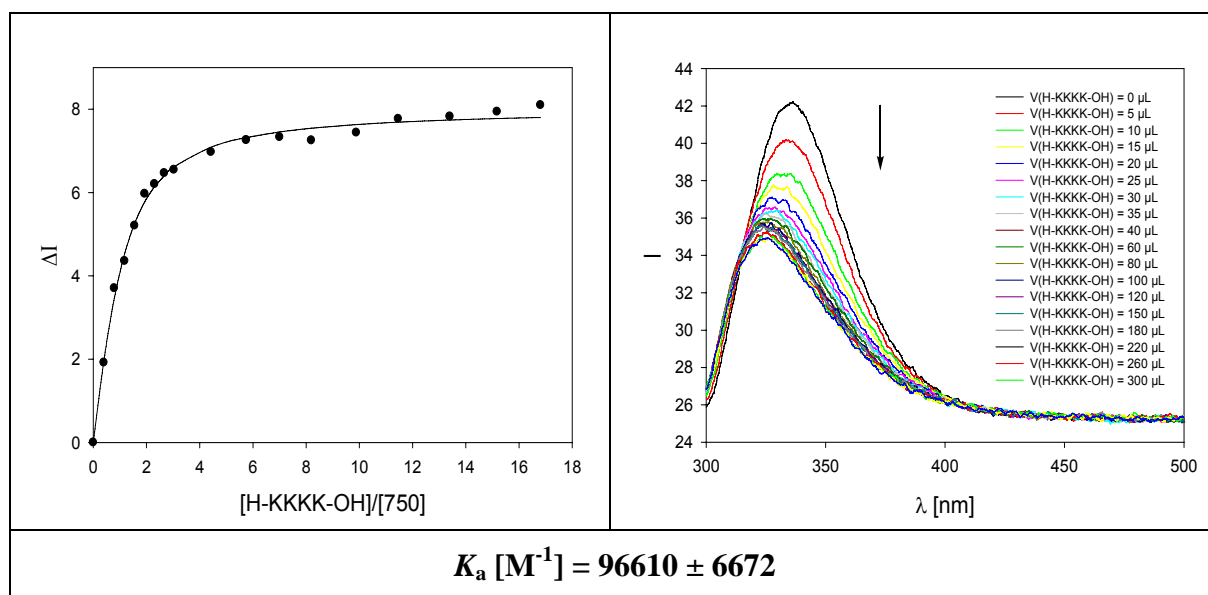


Abbildung 6.11: Fluoreszenztitration zwischen H-KKKK-OH und Tweezer 750 in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an H-KKKK-OH erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers 750 bei Titration mit H-KKKK-OH in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und RGD in Puffer (pH = 7.6)

	Tweezer 750	H-Arg-Gly-Asp-OH
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.18 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.696 ($2.01 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10	0.825
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[RGD] [mol/L]	[RGD]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0.00	0.00	42.7	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.43 \cdot 10^{-5}$	1.57	40.4	2.2	2.2
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.77 \cdot 10^{-5}$	3.10	39.1	3.6	3.6
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	4.58	38.4	4.2	4.5
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.32 \cdot 10^{-4}$	6.02	37.4	5.3	5.1
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.92 \cdot 10^{-4}$	8.80	36.8	5.9	5.9
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.50 \cdot 10^{-4}$	11.43	36.1	6.6	6.4
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.04 \cdot 10^{-4}$	13.93	35.8	6.9	6.8
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.56 \cdot 10^{-4}$	16.31	35.7	7.0	7.0
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.30 \cdot 10^{-4}$	19.67	35.3	7.4	7.3
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.98 \cdot 10^{-4}$	22.80	35.3	7.3	7.5
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.82 \cdot 10^{-4}$	26.65	35.1	7.6	7.6
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.60 \cdot 10^{-4}$	30.19	35.1	7.6	7.7
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.31 \cdot 10^{-4}$	33.44	34.8	7.9	7.8

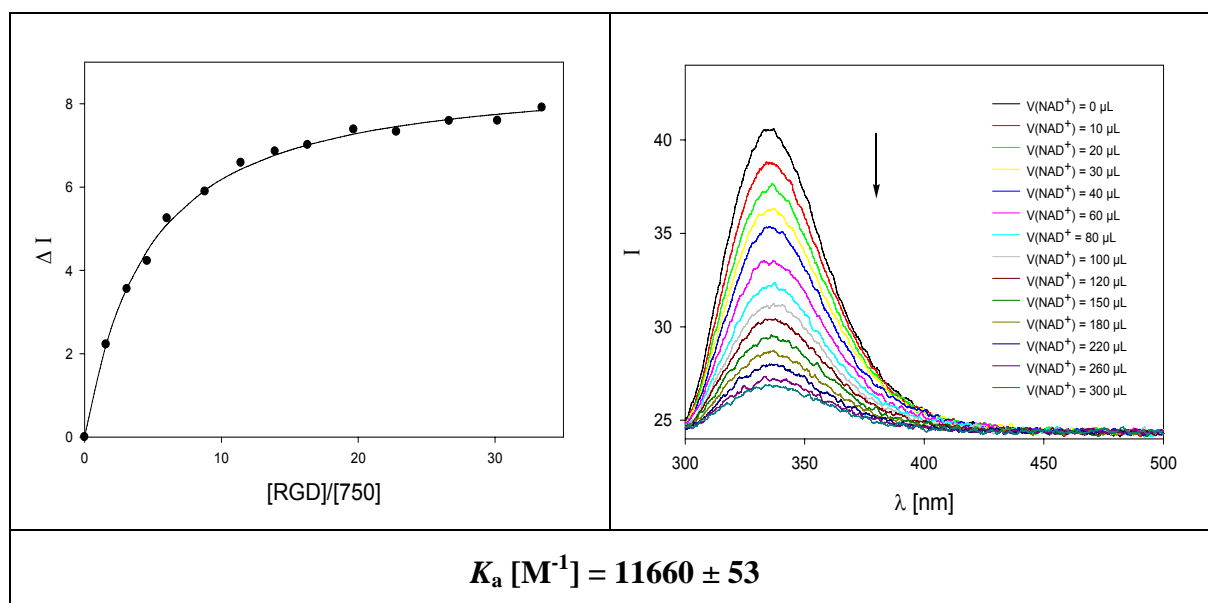


Abbildung 6.12: Fluoreszenztitration zwischen RGD und Tweezer 750 in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an RGD erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers 750 bei Titration mit RGD in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und NAD^+ in Puffer (pH = 7.64)

	Tweezer 750	NAD^+
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.18 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.648 ($9.76 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	10	0.4
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[NAD^+] [mol/L]	[NAD^+]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0.00	0.00	40.5	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.44 \cdot 10^{-5}$	1.57	38.8	1.7	1.7
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.78 \cdot 10^{-5}$	3.10	37.2	3.3	3.2
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	4.59	36.2	4.4	4.4
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.32 \cdot 10^{-4}$	6.04	35.3	5.2	5.4
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.93 \cdot 10^{-4}$	8.82	33.5	7.0	7.1
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.50 \cdot 10^{-4}$	11.46	32.1	8.4	8.3
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.05 \cdot 10^{-4}$	13.97	31.1	9.4	9.3
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.57 \cdot 10^{-4}$	16.35	30.4	10.2	10.2
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.31 \cdot 10^{-4}$	19.72	29.4	11.1	11.1
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.99 \cdot 10^{-4}$	22.85	28.6	11.9	11.9
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.84 \cdot 10^{-4}$	26.72	27.9	12.6	12.6

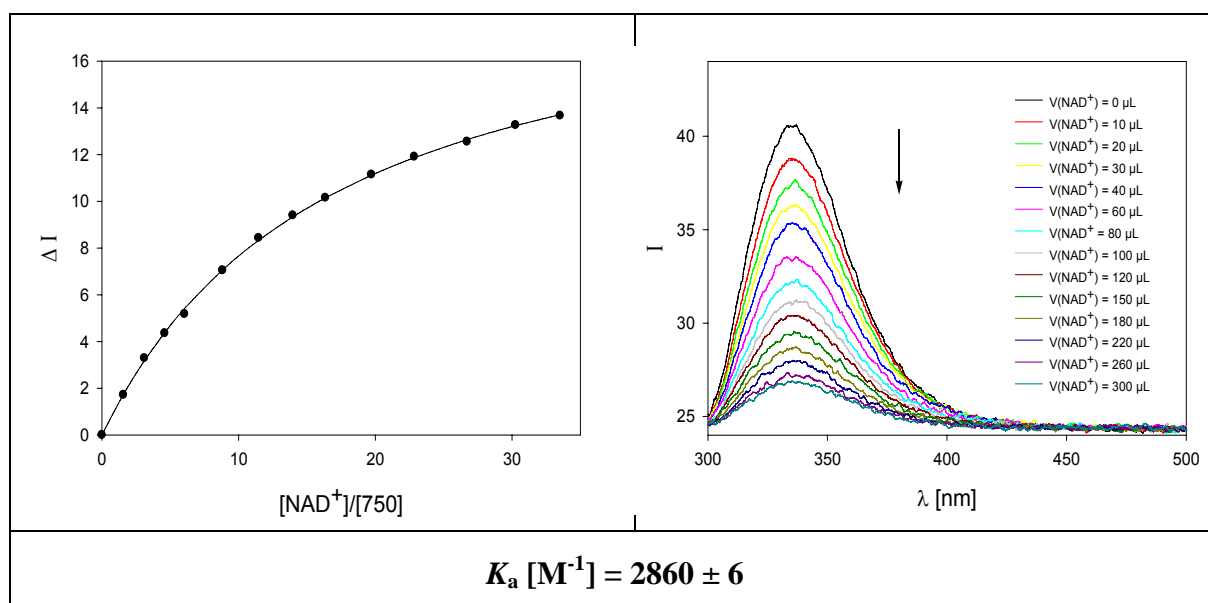


Abbildung 6.13: Fluoreszenztitration zwischen NAD^+ und Tweezer 750 in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an NAD^+ erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers 750 bei Titration mit NAD^+ in Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und NMN in Puffer (pH = 7.6)

	Tweezer 750	NMNA
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.18 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.213 ($1.55 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10	0.7
Konzentration [mol/L]:	$2.18 \cdot 10^{-5}$	$2.2 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[NMNA] [mol/L]	[NMNA]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0.00	0.00	41.5	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.13 \cdot 10^{-5}$	1.43	40.7	0.9	0.7
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.17 \cdot 10^{-5}$	2.82	39.9	1.6	1.4
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.13 \cdot 10^{-5}$	4.18	39.6	1.9	2.0
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.20 \cdot 10^{-4}$	5.49	38.9	2.6	2.6
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.75 \cdot 10^{-4}$	8.02	37.9	3.6	3.5
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.28 \cdot 10^{-4}$	10.42	37.2	4.3	4.3
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.78 \cdot 10^{-4}$	12.70	36.5	5.0	4.9
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.25 \cdot 10^{-4}$	14.87	36.1	5.4	5.6
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.92 \cdot 10^{-4}$	17.93	35.3	6.2	6.3
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.54 \cdot 10^{-4}$	20.79	34.6	6.9	6.9
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.31 \cdot 10^{-4}$	24.30	33.8	7.7	7.6
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.02 \cdot 10^{-4}$	27.52	33.5	8.0	8.1
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.66 \cdot 10^{-4}$	30.49	32.8	8.7	8.6

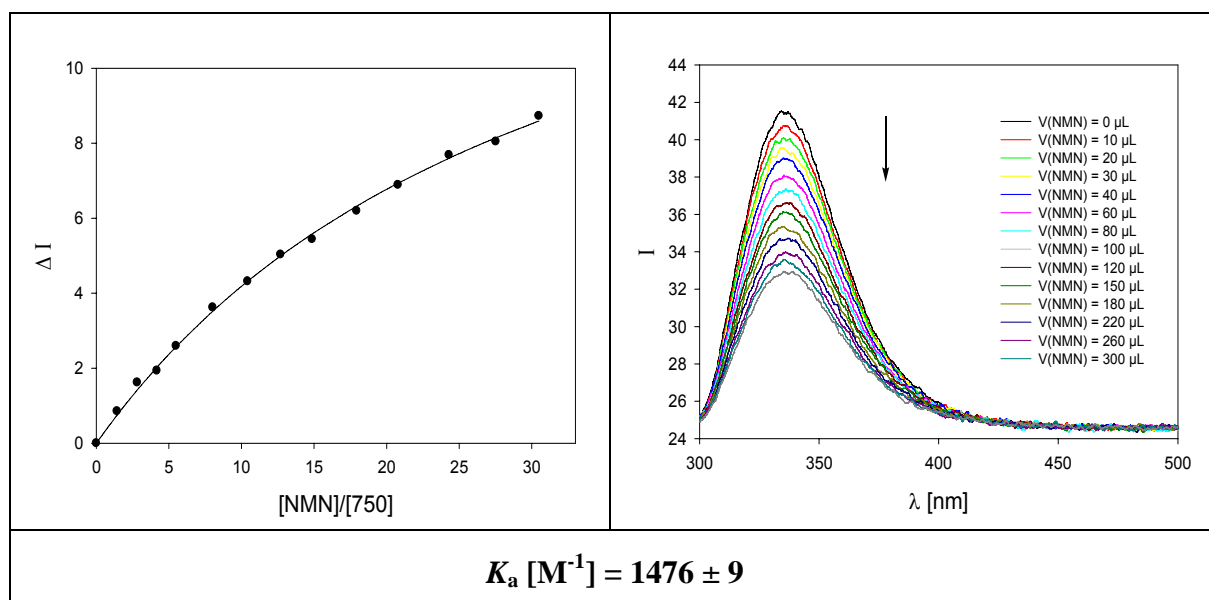


Abbildung 6.14: Fluoreszenztitration zwischen NMNA und Tweezer **750** in Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an NMNA erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit NMNA in Puffer.

6.7.2 Fluoreszenztitrationen im Rahmen des PARP-1-Projektes

6.7.2.1 Überprüfung einer Komplexbildung zwischen Tweezer 750 und Benzamid (BA)

Fluoreszenztitration zwischen Benzamid (BA) und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0)

	Tweezer 750	Benzamid
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.196 ($1.61 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.65
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.49 \cdot 10^{-3}$

V _{Gast} [μL]	V _{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[Benzamid] [mol/L]	[Benzamid]/ [750]	I 334 nm	Δ I _{obs}	Δ I _{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	147.7	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.51 \cdot 10^{-5}$	1.60	143.9	3.8	2.2
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.91 \cdot 10^{-5}$	3.16	142.6	5.1	4.2
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.02 \cdot 10^{-4}$	4.68	140.1	7.6	6.0
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.35 \cdot 10^{-4}$	6.16	140.4	7.2	7.8
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.97 \cdot 10^{-4}$	8.99	136.5	11.2	10.9
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.55 \cdot 10^{-4}$	11.68	134.3	13.4	13.7
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.11 \cdot 10^{-4}$	14.24	132.0	15.7	16.2
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.64 \cdot 10^{-4}$	16.67	129.9	17.8	18.4
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.39 \cdot 10^{-4}$	20.10	126.4	21.2	21.2
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.09 \cdot 10^{-4}$	23.30	124.7	22.9	23.7
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.95 \cdot 10^{-4}$	27.23	121.3	26.4	26.6
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.74 \cdot 10^{-4}$	30.85	117.4	30.3	29.0
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.47 \cdot 10^{-4}$	34.17	116.9	30.8	31.0

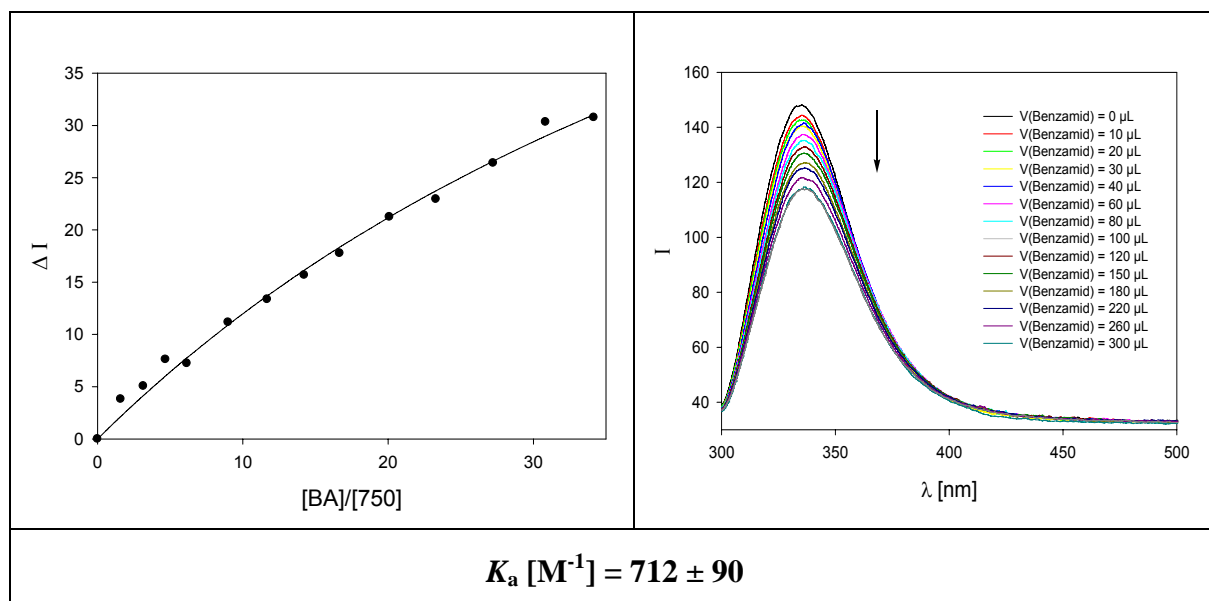


Abbildung 6.15: Fluoreszenztitration zwischen Benzamid und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Benzamid erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Benzamid in Tris-Puffer.

6.7.2.2 Überprüfung einer Komplexbildung zwischen Tweezer 750 und der DNA

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und der DNA in Tris-Puffer (pH = 8.0) bei niedriger Stöchiometrie (16-facher Überschuss an 750)

	DNA	Tweezer 750
Einwaage [mg]:	$5 \cdot 10^{-5}$ mol/L	0.06 ($8.00 \cdot 10^{-5}$ mmol)
Volumen [mL]:	1:10 verdünnen	0.3
Konzentration [mol/L]:	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$2.67 \cdot 10^{-4}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[DNA] [mol/L]	[750] [mol/L]	[750]/ [DNA]	I 524 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$5.00 \cdot 10^{-6}$	0	0	475.0	0.0	0
10	710	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$3.75 \cdot 10^{-6}$	0.75	480.3	5.3	1.4
20	720	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$7.40 \cdot 10^{-6}$	1.48	477.7	2.7	2.8
30	730	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$1.10 \cdot 10^{-5}$	2.19	476.9	1.9	4.1
40	740	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$1.44 \cdot 10^{-5}$	2.88	476.1	1.1	5.4
60	760	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$2.10 \cdot 10^{-5}$	4.21	484.2	9.2	7.9
80	780	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$2.73 \cdot 10^{-5}$	5.46	481.4	6.4	10.2
100	800	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$3.33 \cdot 10^{-5}$	6.66	489.8	14.8	12.4
120	820	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$3.90 \cdot 10^{-5}$	7.79	488.5	13.5	14.5
150	850	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$4.70 \cdot 10^{-5}$	9.4	494.5	19.5	17.4
180	880	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$5.45 \cdot 10^{-5}$	10.9	495.7	20.7	20.1
220	920	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$6.37 \cdot 10^{-5}$	12.74	500.9	25.9	23.4
260	960	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$7.22 \cdot 10^{-5}$	14.43	500.8	25.8	26.4
300	1000	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$8.00 \cdot 10^{-5}$	15.98	502.4	27.4	29.1

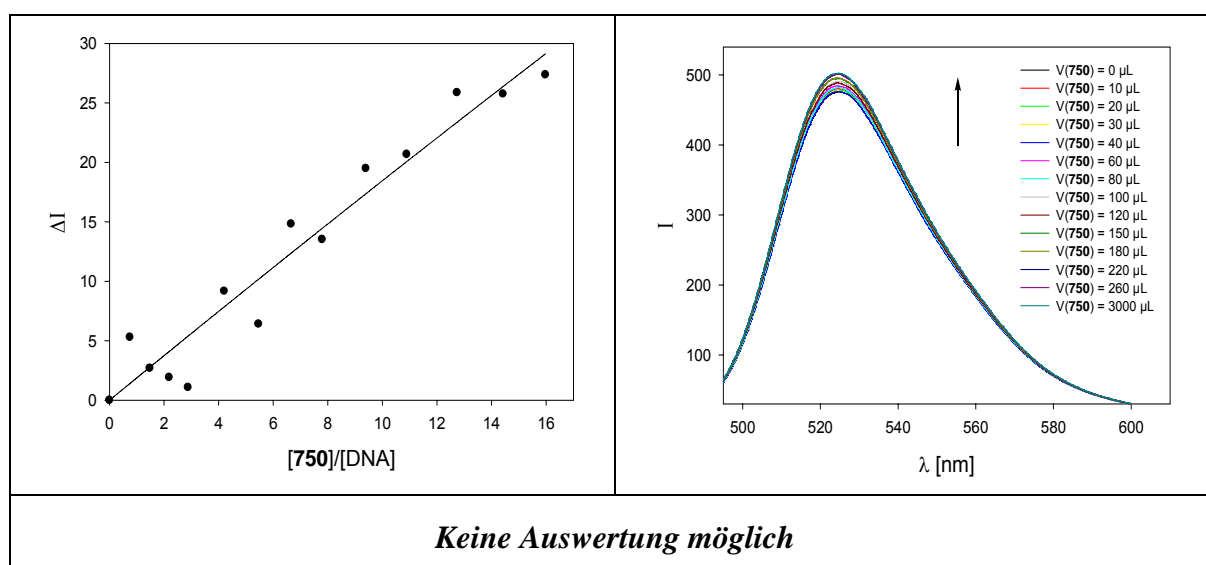


Abbildung 6.16: Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und der „intakten“ DNA in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 485 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 524 nm als Funktion der Äquivalente an Tweezer 750 erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung der DNA bei Titration mit Tweezer 750 in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Tweezer 750 und der DNA in Tris-Puffer (pH = 8.0) bei höherer Stöchiometrie (300-facher Überschuss an 750)

	DNA	Tweezer 750
Einwaage [mg]:	$5 \cdot 10^{-5}$ mol/L	1.312 ($1.75 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	1:10 verdünnen	0.3
Konzentration [mol/L]:	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$5.83 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[DNA] [mol/L]	[750] [mol/L]	[750]/ [DNA]	I 524 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$5.00 \cdot 10^{-6}$	0	0	490.4	0.0	0.0
10	710	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$8.21 \cdot 10^{-5}$	16.40	531.5	41.1	43.7
20	720	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$1.62 \cdot 10^{-4}$	32.35	569.9	79.5	81.1
30	730	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$2.40 \cdot 10^{-4}$	47.87	600.8	110.4	113.6
40	740	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$3.15 \cdot 10^{-4}$	62.96	630.3	139.9	141.9
60	760	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$4.60 \cdot 10^{-4}$	91.95	675.7	185.3	189.2
80	780	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$5.98 \cdot 10^{-4}$	119.46	721.9	231.5	226.9
100	800	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$7.29 \cdot 10^{-4}$	145.59	750.9	260.4	257.8
120	820	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$8.53 \cdot 10^{-4}$	170.45	776.6	286.1	283.5
150	850	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$1.03 \cdot 10^{-3}$	205.54	805.5	315.1	314.9
180	880	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$1.19 \cdot 10^{-3}$	238.24	835.1	344.7	340.0
220	920	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$1.39 \cdot 10^{-3}$	278.52	854.2	363.8	366.5
260	960	$5.00 \cdot 10^{-6}$	$1.58 \cdot 10^{-3}$	315.45	874.0	383.6	387.5

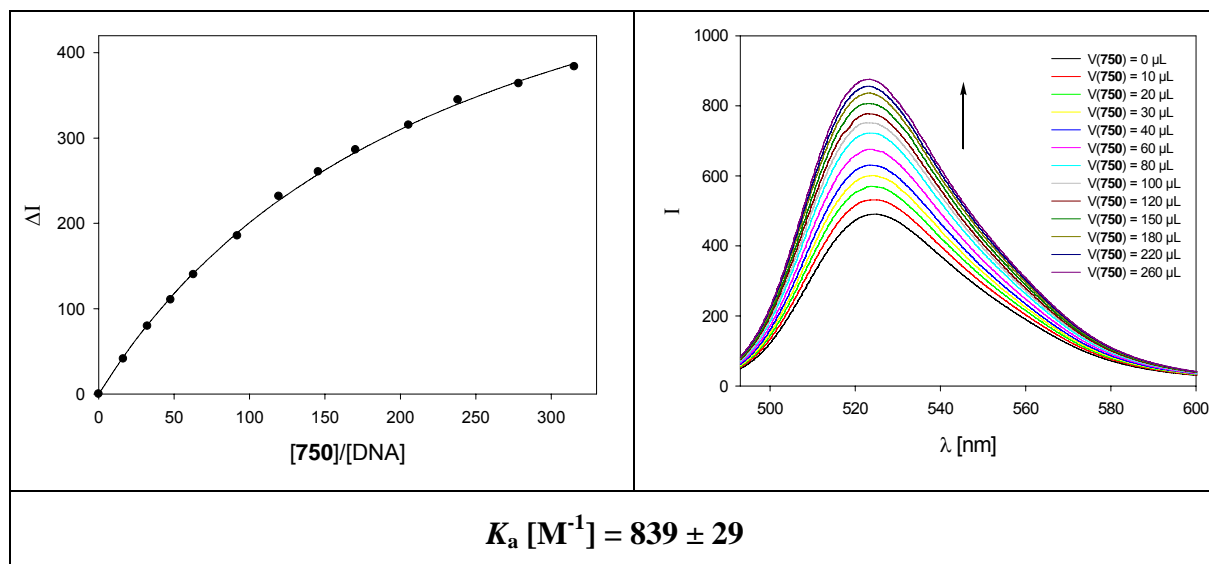


Abbildung 6.17: Fluoreszenztitration zwischen Tweezer **750** und der „intakten“ DNA in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 485 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 524 nm als Funktion der Äquivalente an Tweezer **750** erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung der DNA bei Titration mit Tweezer **750** in Tris-Puffer.

6.7.2.3 Fluoreszenztitrationen des Tweezers 750 mit verschiedenen Übergangsmetall-Ionen, Erdalkalimetall-Ionen und Alkalimetall-Ionen

Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (6-facher Überschuss an Zinkchlorid)

	Tweezer 750	Zinkchlorid
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.180 ($1.32 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	3.20
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.14 \cdot 10^{-4}$

V _{Gast} [μL]	V _{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[ZnCl ₂] [mol/L]	[ZnCl ₂]/ [750]	I 334 nm	Δ I _{obs}	Δ I _{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	130.0	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.81 \cdot 10^{-6}$	0.27	121.7	8.3	8.1
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.15 \cdot 10^{-5}$	0.52	115.0	15.1	15.0
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.70 \cdot 10^{-5}$	0.78	109.4	20.7	20.6
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.23 \cdot 10^{-5}$	1.02	106.6	23.5	24.7
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.26 \cdot 10^{-5}$	1.49	100.3	29.8	29.7
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.23 \cdot 10^{-5}$	1.94	97.3	32.7	32.2
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.16 \cdot 10^{-5}$	2.36	95.9	34.1	33.6
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.04 \cdot 10^{-5}$	2.76	95.2	34.9	34.4
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.28 \cdot 10^{-5}$	3.33	94.4	35.7	35.2
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.44 \cdot 10^{-5}$	3.86	94.4	35.6	35.7
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.87 \cdot 10^{-5}$	4.52	93.8	36.2	36.1
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.12 \cdot 10^{-4}$	5.11	94.3	35.7	36.4
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.24 \cdot 10^{-4}$	5.67	93.9	36.2	36.6

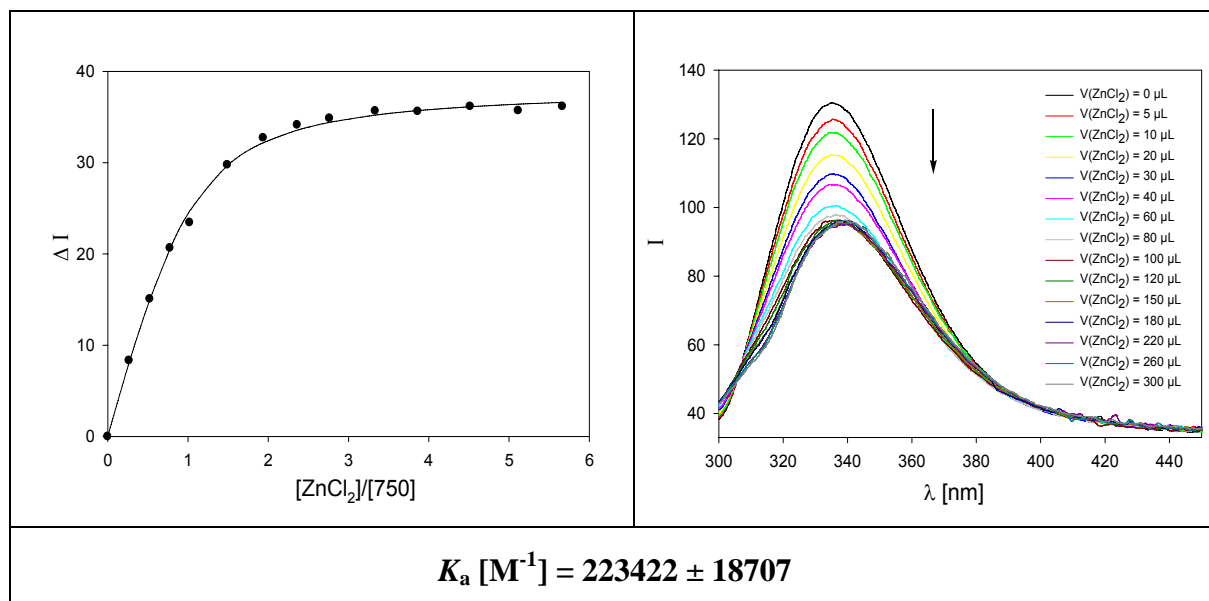


Abbildung 6.18: Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Zinkchlorid erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Zinkchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (40-facher Überschuss an Zinkchlorid)

	Tweezer 750	Zinkchlorid
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	1.2 ($8.80 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.700
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.93 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[Zinkchlorid] [mol/L]	[Zinkchlorid]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	152.3	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.13 \cdot 10^{-5}$	1.89	103.3	49.0	47.9
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.15 \cdot 10^{-5}$	3.73	91.7	60.6	49.0
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.21 \cdot 10^{-4}$	5.52	90.8	61.5	49.2
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.59 \cdot 10^{-4}$	7.26	93.9	58.4	49.3
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.32 \cdot 10^{-4}$	10.60	97.9	54.4	49.4
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.01 \cdot 10^{-4}$	13.77	102.0	50.2	49.4
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.67 \cdot 10^{-4}$	16.79	104.5	47.8	49.4
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.30 \cdot 10^{-4}$	19.65	107.6	44.7	49.5
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.18 \cdot 10^{-4}$	23.70	109.8	42.5	49.5
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.00 \cdot 10^{-4}$	27.47	110.8	41.5	49.5
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.02 \cdot 10^{-4}$	32.11	109.2	43.1	49.5
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.95 \cdot 10^{-4}$	36.37	107.9	44.4	49.5
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.80 \cdot 10^{-4}$	40.29	106.6	45.7	49.5

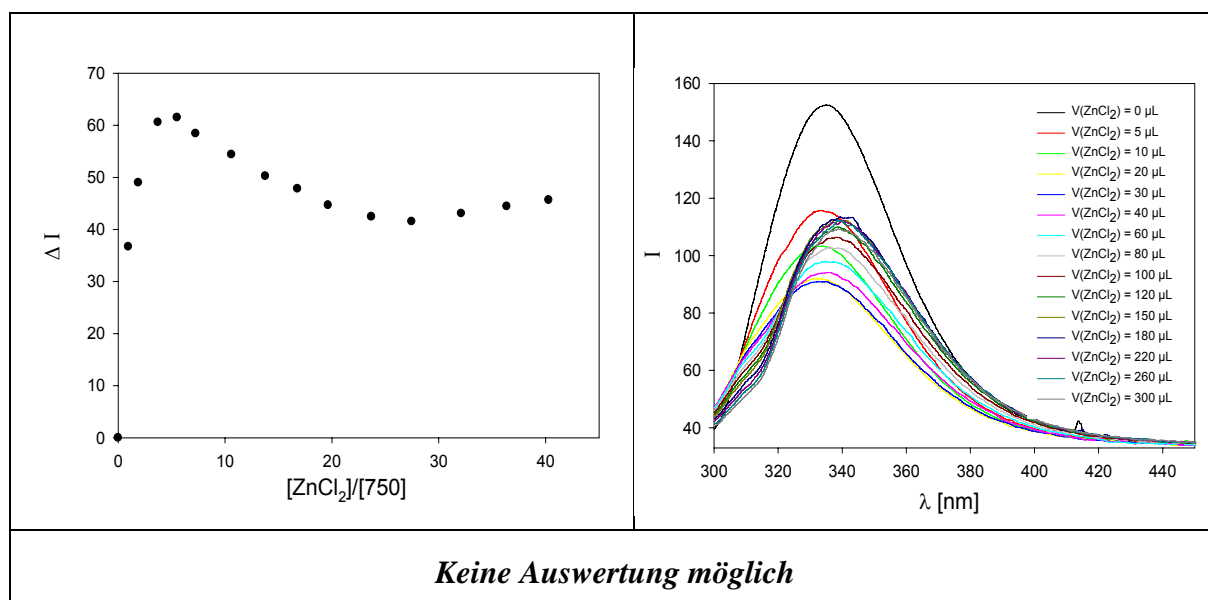


Abbildung 6.19: Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Zinkchlorid erhalten wurde. Die Bestimmung einer Bindungskonstante war hier nicht möglich. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Zinkchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (260-facher Überschuss an Zinkchlorid)

	Tweezer 750	Zinkchlorid
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	1.8 ($1.32 \cdot 10^{-2}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.700
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.89 \cdot 10^{-2}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[ZnCl ₂] [mol/L]	[ZnCl ₂]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	151.5	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.66 \cdot 10^{-4}$	12.16	89.9	61.6	35.2
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.24 \cdot 10^{-4}$	23.98	97.5	54.0	48.4
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.75 \cdot 10^{-4}$	35.48	106.8	44.6	55.2
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.02 \cdot 10^{-3}$	46.66	106.8	44.7	59.4
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.49 \cdot 10^{-3}$	68.15	103.9	47.5	64.2
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.94 \cdot 10^{-3}$	88.54	98.3	53.2	66.9
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.36 \cdot 10^{-3}$	107.91	91.2	60.2	68.6
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.76 \cdot 10^{-3}$	126.33	85.9	65.5	69.8
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.33 \cdot 10^{-3}$	152.34	80.4	71.1	71.0
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.86 \cdot 10^{-3}$	176.58	74.2	77.3	71.9
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.51 \cdot 10^{-3}$	206.43	69.9	81.6	72.7
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.11 \cdot 10^{-3}$	233.80	65.5	85.9	73.2
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.66 \cdot 10^{-3}$	258.98	62.2	89.3	73.6

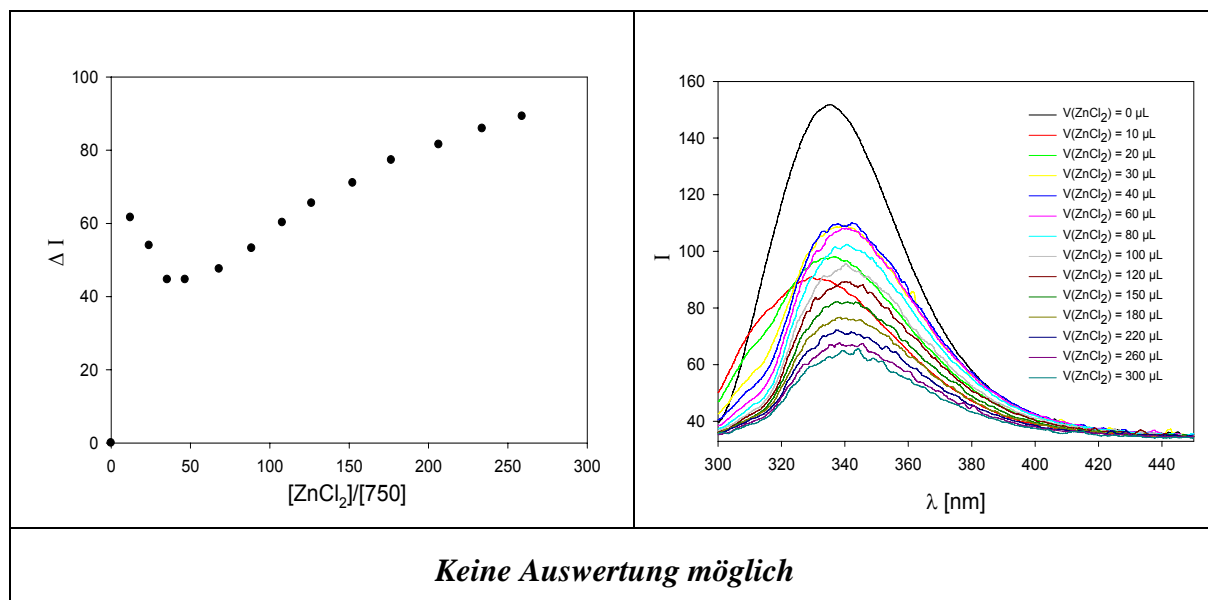


Abbildung 6.20: Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Zinkchlorid erhalten wurde. Die Bestimmung einer Bindungskonstante war hier nicht möglich. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Zinkchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Kupfer(II)-sulfat und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (40-facher Überschuss an Kupfer(II)-sulfat)

	Tweezer 750	Kupfer(II)-sulfat
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.525 ($3.29 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	1.1
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.99 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[CuSO ₄] [mol/L]	[CuSO ₄]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	146.4	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.21 \cdot 10^{-5}$	1.93	135.1	11.3	11.5
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.31 \cdot 10^{-5}$	3.80	124.8	21.7	21.3
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.23 \cdot 10^{-4}$	5.62	117.9	28.5	29.7
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.62 \cdot 10^{-4}$	7.40	110.8	35.6	37.0
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.36 \cdot 10^{-4}$	10.80	98.4	48.0	48.9
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.07 \cdot 10^{-4}$	14.03	87.9	58.5	58.4
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.74 \cdot 10^{-4}$	17.10	80.1	66.3	66.0
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.38 \cdot 10^{-4}$	20.02	72.4	74.0	72.2
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.28 \cdot 10^{-4}$	24.14	65.0	81.4	79.8
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.12 \cdot 10^{-4}$	27.99	59.8	86.6	85.8
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.15 \cdot 10^{-4}$	23.72	54.4	92.0	92.1
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.10 \cdot 10^{-4}$	37.05	49.9	96.5	97.0
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.97 \cdot 10^{-4}$	41.05	47.0	99.4	101.0

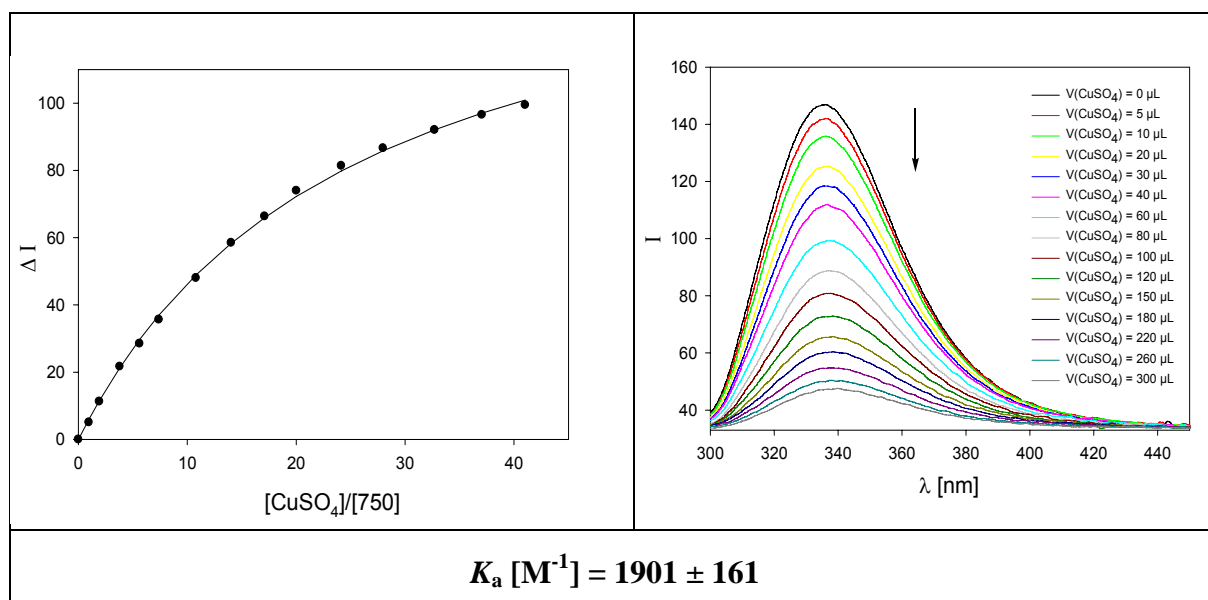


Abbildung 6.21: Fluoreszenztitration zwischen Kupfer(II)-sulfat und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Kupfer(II)-sulfat erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Kupfer(II)-sulfat in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Eisen(II)-sulfat und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (30-facher Überschuss an Eisen(II)-sulfat)

	Tweezer 750	Eisen(II)-sulfat
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.6 ($2.16 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	1.1
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.96 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[FeSO ₄] [mol/L]	[FeSO ₄]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	146.2	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.76 \cdot 10^{-5}$	1.26	123.1	23.0	22.5
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.45 \cdot 10^{-5}$	2.49	108.5	37.7	39.0
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.06 \cdot 10^{-5}$	3.69	97.1	49.0	51.4
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.06 \cdot 10^{-4}$	4.85	87.6	58.6	61.0
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.55 \cdot 10^{-4}$	7.09	70.6	75.5	74.9
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.01 \cdot 10^{-4}$	9.21	61.1	85.1	84.4
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.45 \cdot 10^{-4}$	11.22	53.0	93.2	91.2
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.87 \cdot 10^{-4}$	13.14	47.0	99.2	96.3
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.46 \cdot 10^{-4}$	15.84	41.8	104.4	102.1
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.01 \cdot 10^{-4}$	18.36	38.3	107.8	106.3
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.69 \cdot 10^{-4}$	21.47	35.9	110.2	110.3
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.31 \cdot 10^{-4}$	24.31	34.6	111.5	113.3
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.89 \cdot 10^{-4}$	26.93	34.3	111.8	115.6

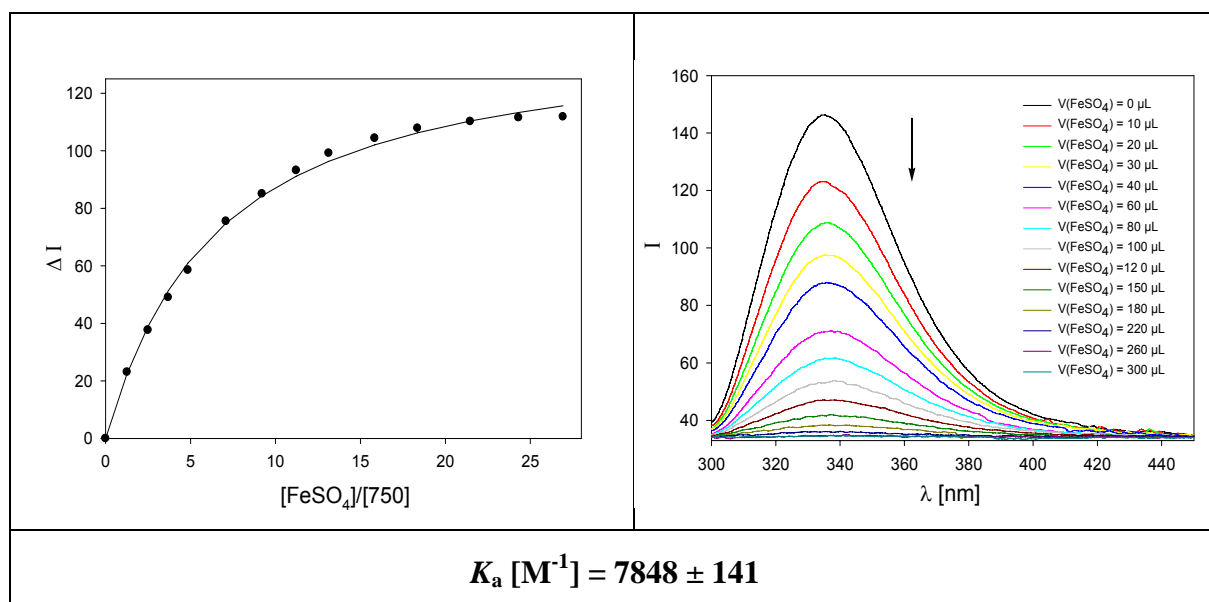


Abbildung 6.22: Fluoreszenztitration zwischen Eisen(II)-sulfat und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Eisen(II)-sulfat erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Eisen(II)-sulfat in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Eisen(III)-chlorid und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (30-facher Überschuss an Eisen(III)-chlorid)

	Tweezer 750	Eisen(III)-chlorid
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.575 ($2.50 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	1.1
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.27 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[FeCl ₃] [mol/L]	[FeCl ₃]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	145.3	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.20 \cdot 10^{-5}$	1.46	129.0	16.4	17.5
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.30 \cdot 10^{-5}$	2.88	115.5	29.9	31.2
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.33 \cdot 10^{-5}$	4.27	104.7	40.6	42.2
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.23 \cdot 10^{-4}$	5.61	92.8	52.6	51.2
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.79 \cdot 10^{-4}$	8.20	82.5	62.8	64.9
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.33 \cdot 10^{-4}$	10.65	70.3	75.0	74.9
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.84 \cdot 10^{-4}$	12.98	62.1	83.3	82.4
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.32 \cdot 10^{-4}$	15.20	54.9	90.4	88.3
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.01 \cdot 10^{-4}$	18.33	48.3	97.0	95.1
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.64 \cdot 10^{-4}$	21.24	43.4	101.9	100.3
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.43 \cdot 10^{-4}$	24.83	39.4	105.9	105.4
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.15 \cdot 10^{-4}$	28.13	37.4	107.9	109.3
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.81 \cdot 10^{-4}$	31.16	35.9	109.4	112.3

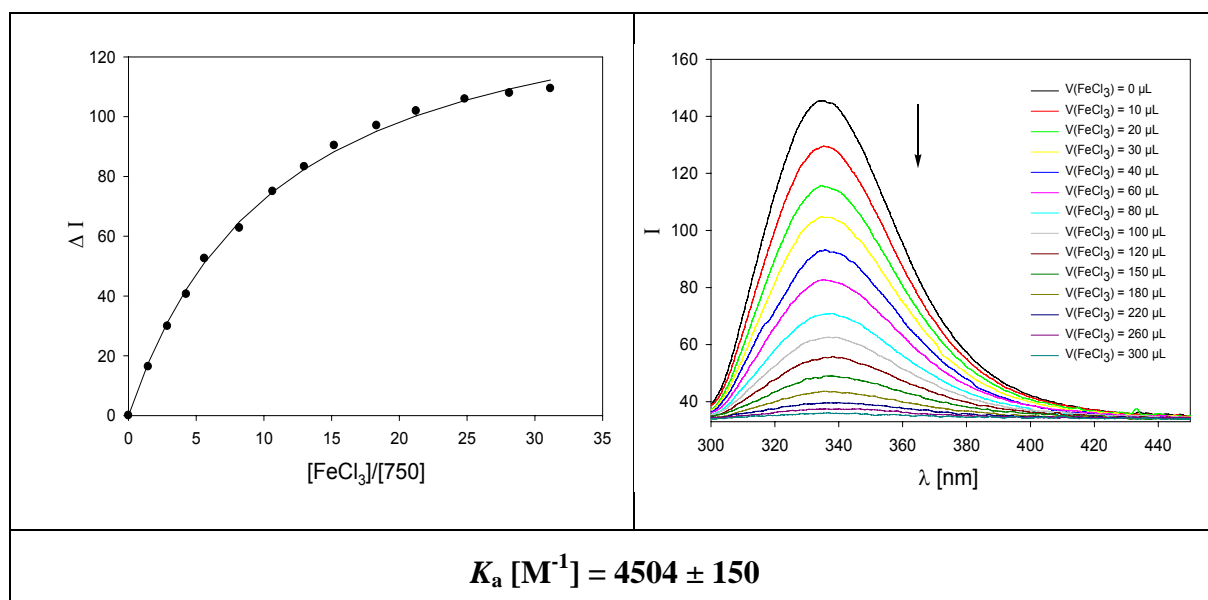


Abbildung 6.23: Fluoreszenztitration zwischen Eisen(III)-chlorid und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Eisen(III)-chlorid erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Eisen(III)-chlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Calciumchlorid und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (350-facher Überschuss an Calciumchlorid)

	Tweezer 750	Calciumchlorid
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	2.0 ($1.80 \cdot 10^{-2}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.700
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.57 \cdot 10^{-2}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[CaCl ₂] [mol/L]	[CaCl ₂]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	143.1	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.63 \cdot 10^{-4}$	16.59	142.9	0.2	0.4
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.15 \cdot 10^{-4}$	32.72	143.0	0.1	0.9
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.06 \cdot 10^{-3}$	48.40	143.0	0.1	1.3
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.39 \cdot 10^{-3}$	36.67	143.7	0.7	1.7
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.03 \cdot 10^{-3}$	92.99	143.2	0.1	2.5
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.64 \cdot 10^{-3}$	120.80	141.3	1.8	3.2
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.22 \cdot 10^{-3}$	147.23	140.2	2.9	3.9
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.77 \cdot 10^{-3}$	172.37	139.6	3.5	4.6
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.54 \cdot 10^{-3}$	207.85	138.2	4.9	5.6
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.27 \cdot 10^{-3}$	240.92	137.3	5.8	6.4
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.16 \cdot 10^{-3}$	281.66	134.8	8.3	7.5
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.97 \cdot 10^{-3}$	319.00	133.7	9.4	8.5
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.72 \cdot 10^{-3}$	353.35	131.9	11.2	9.4

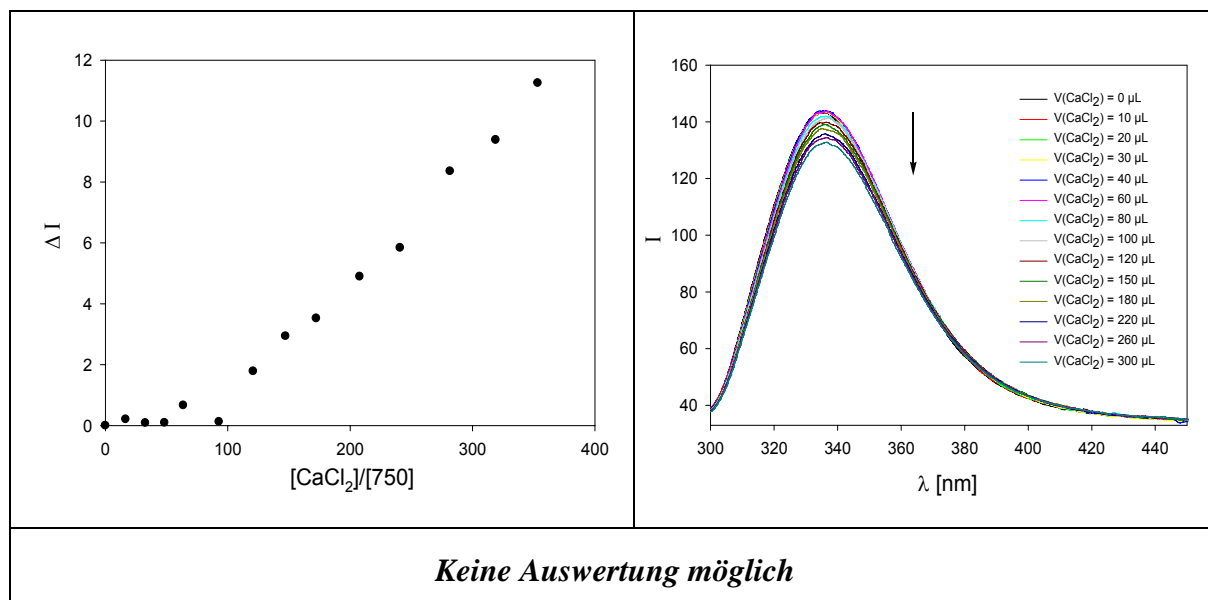


Abbildung 6.24: Fluoreszenztitration zwischen Calciumchlorid und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Calciumchlorid erhalten wurde. Die Bestimmung einer Bindungskonstante war hier nicht möglich. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Calciumchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Magnesiumchlorid und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (350-facher Überschuss an Magnesiumchlorid)

	Tweezer 750	Magnesiumchlorid
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	3.3 ($1.62 \cdot 10^{-2}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.700
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.32 \cdot 10^{-2}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	[MgCl ₂] [mol/L]	[MgCl ₂]/ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	151.9	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.27 \cdot 10^{-4}$	14.94	152.1	0.3	3.1
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.44 \cdot 10^{-4}$	29.47	152.9	1.0	3.2
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.53 \cdot 10^{-4}$	43.60	153.5	1.6	3.2
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.25 \cdot 10^{-3}$	57.35	154.3	2.4	3.3
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.83 \cdot 10^{-3}$	83.76	152.8	0.9	3.3
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.38 \cdot 10^{-3}$	108.82	154.5	2.6	3.3
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.90 \cdot 10^{-3}$	132.62	154.5	2.7	3.3
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.39 \cdot 10^{-3}$	155.26	154.5	2.6	3.3
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.09 \cdot 10^{-3}$	187.23	154.6	2.8	3.3
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.74 \cdot 10^{-3}$	217.01	153.9	2.0	3.3
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.54 \cdot 10^{-3}$	253.70	153.6	1.8	3.3
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.28 \cdot 10^{-3}$	287.34	153.1	1.3	3.3
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.96 \cdot 10^{-3}$	318.28	151.3	0.6	3.3

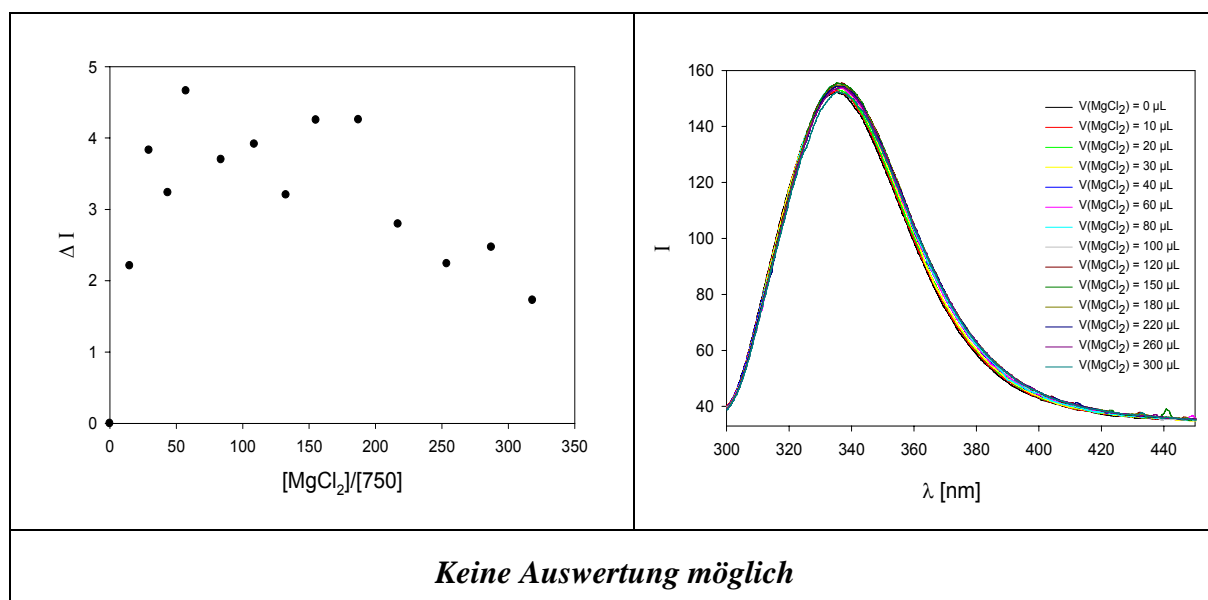


Abbildung 6.25: Fluoreszenztitration zwischen Magnesiumchlorid und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Magnesiumchlorid erhalten wurde. Die Bestimmung einer Bindungskonstante war hier nicht möglich. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Magnesiumchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Caesiumcarbonat und dem Tweezer 750 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (40-facher Überschuss an Caesiumcarbonat)

	Tweezer 750	Caesiumcarbonat
Einwaage [mg]:	0.164 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.95 ($2.92 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	1.0
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.92 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[750] [mol/L]	$[\text{Cs}_2\text{CO}_3]$ [mol/L]	$[\text{Cs}_2\text{CO}_3]/$ [750]	I 334 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	147.8	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.11 \cdot 10^{-5}$	1.88	145.3	2.5	2.8
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.10 \cdot 10^{-5}$	3.70	142.4	5.4	5.4
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.20 \cdot 10^{-4}$	5.48	139.4	8.3	7.8
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.58 \cdot 10^{-4}$	7.21	136.4	11.3	10.0
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.30 \cdot 10^{-4}$	10.53	133.1	14.7	13.9
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.99 \cdot 10^{-4}$	13.68	130.3	17.4	17.4
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.64 \cdot 10^{-4}$	16.67	128.4	19.3	20.4
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.27 \cdot 10^{-4}$	19.51	125.5	22.2	23.0
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.15 \cdot 10^{-4}$	23.53	122.1	25.6	26.5
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.96 \cdot 10^{-4}$	27.27	117.4	30.4	29.4
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.97 \cdot 10^{-4}$	31.89	115.7	32.1	32.7
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.90 \cdot 10^{-4}$	36.11	112.4	35.4	35.5
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$8.75 \cdot 10^{-4}$	40.00	109.3	38.5	37.8

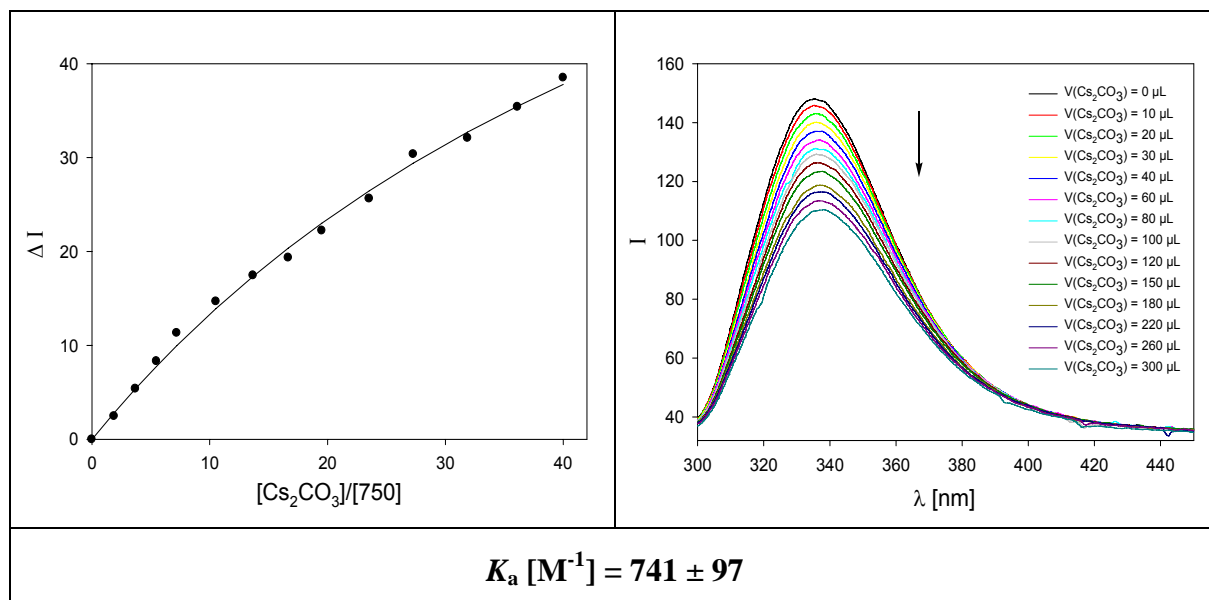


Abbildung 6.26: Fluoreszenztitration zwischen Caesiumcarbonat und Tweezer **750** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 334 nm als Funktion der Äquivalente an Caesiumcarbonat erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **750** bei Titration mit Caesiumcarbonat in Tris-Puffer.

6.7.2.4 Fluoreszenztitrationen des Clips 622 mit verschiedenen Übergangsmetall-Ionen, Erdalkimetal-Ionen und Alkalimetall-Ionen

Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und dem Clip 622 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (340-facher Überschuss an Zinkchlorid)

	Clip 622	Zinkchlorid
Einwaage [mg]:	0.17 ($2.73 \cdot 10^{-4}$ mmol)	2.30 ($2.07 \cdot 10^{-2}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.7
Konzentration [mol/L]:	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.96 \cdot 10^{-2}$

V _{Gast} [μL]	V _{gesamt} [μL]	[622] [mol/L]	[ZnCl ₂] [mol/L]	[ZnCl ₂]/ [622]	I 347 nm	Δ I _{obs}	Δ I _{calc}
0	700	$2.73 \cdot 10^{-5}$	0	0	285.1	0.0	0.0
10	710	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.22 \cdot 10^{-4}$	15.5	217.0	68.1	113.7
20	720	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.33 \cdot 10^{-4}$	30.5	129.0	156.1	156.3
30	730	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.23 \cdot 10^{-3}$	45.1	86.5	198.6	178.4
40	740	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.63 \cdot 10^{-3}$	59.3	68.1	217.0	191.9
60	760	$2.37 \cdot 10^{-5}$	$2.37 \cdot 10^{-3}$	86.6	58.8	226.4	207.5
80	780	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.07 \cdot 10^{-3}$	112.5	54.7	230.5	216.3
100	800	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.75 \cdot 10^{-3}$	137.1	55.4	229.8	221.9
120	820	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.39 \cdot 10^{-3}$	160.5	56.1	229.0	225.8
150	850	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$5.29 \cdot 10^{-3}$	193.6	57.1	228.1	229.8
180	880	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.13 \cdot 10^{-3}$	224.4	59.2	226.0	232.6
220	920	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$7.17 \cdot 10^{-3}$	262.3	60.7	224.5	235.2
260	960	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.12 \cdot 10^{-3}$	297.1	64.5	220.7	237.0
300	1000	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.99 \cdot 10^{-3}$	329.1	65.0	220.1	238.3

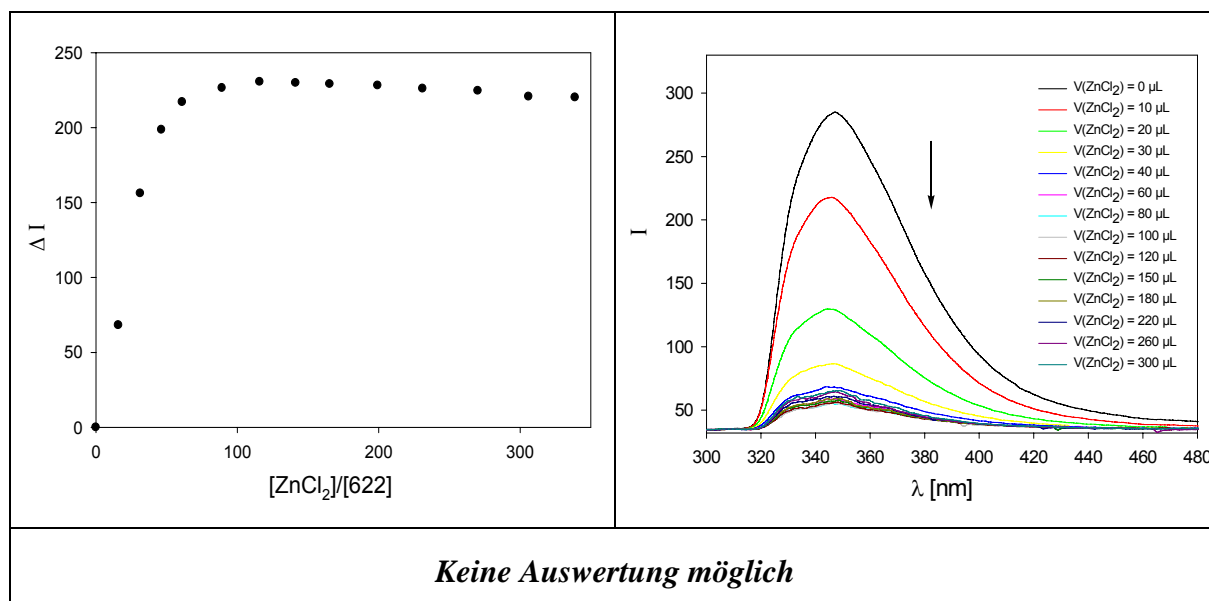


Abbildung 6.27: Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und Clip **622** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 347 nm als Funktion der Äquivalente an Zinkchlorid erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips **622** bei Titration mit Zinkchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und dem Clip 622 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (30-facher Überschuss an Zinkchlorid)

	Clip 622	Zinkchlorid
Einwaage [mg]:	0.17 ($2.73 \cdot 10^{-4}$ mmol)	2.30 ($2.07 \cdot 10^{-2}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.7
Konzentration [mol/L]:	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.96 \cdot 10^{-2}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[622] [mol/L]	[ZnCl ₂] [mol/L]	[ZnCl ₂]/ [622]	I 347 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.73 \cdot 10^{-5}$	0	0	275.5	0.0	0.0
10	710	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.45 \cdot 10^{-5}$	1.26	275.9	0.4	4.9
20	720	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.81 \cdot 10^{-5}$	2.49	276.1	0.6	9.7
30	730	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.01 \cdot 10^{-4}$	3.68	274.9	0.6	14.4
40	740	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.32 \cdot 10^{-4}$	4.85	273.4	2.0	18.9
60	760	$2.37 \cdot 10^{-5}$	$1.93 \cdot 10^{-4}$	7.08	267.9	7.5	27.6
80	780	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.51 \cdot 10^{-4}$	9.2	262.5	12.9	35.8
100	800	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.06 \cdot 10^{-4}$	11.21	253.0	22.4	43.7
120	820	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.59 \cdot 10^{-4}$	13.12	242.1	33.3	51.1
150	850	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.32 \cdot 10^{-4}$	15.82	220.9	54.6	61.6
180	880	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$5.01 \cdot 10^{-4}$	18.34	205.6	69.8	71.4
220	920	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$5.86 \cdot 10^{-4}$	21.44	185.4	90.0	83.4
260	960	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.64 \cdot 10^{-4}$	24.28	166.0	109.5	94.4
300	1000	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$7.35 \cdot 10^{-4}$	26.90	147.9	127.5	104.5

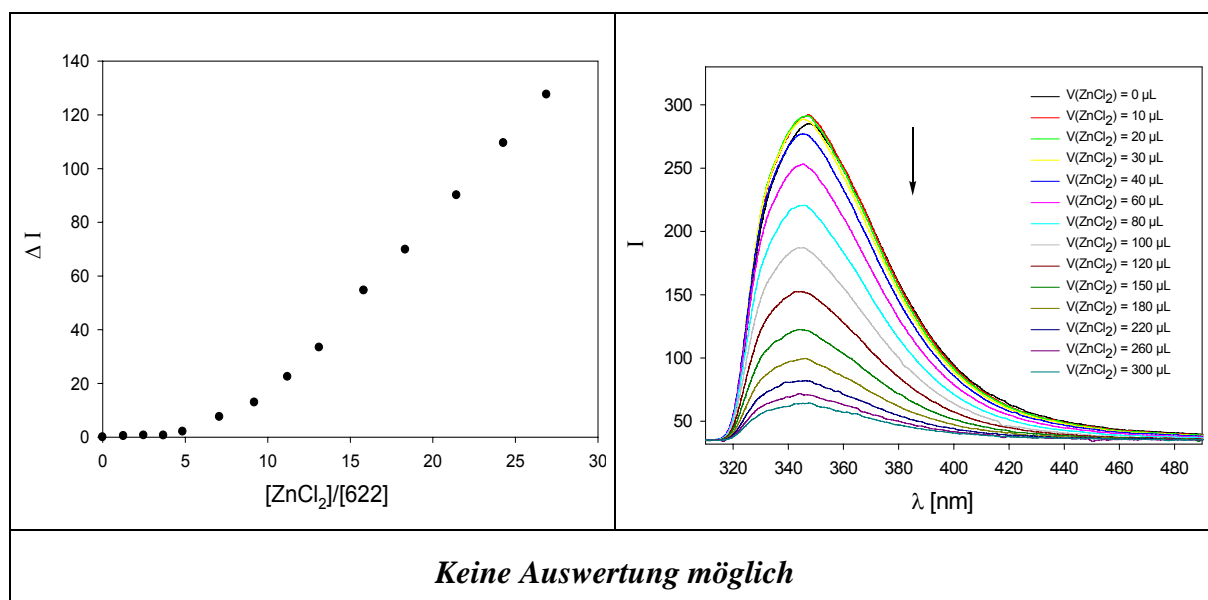


Abbildung 6.28: Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und Clip 622 in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 347 nm als Funktion der Äquivalente an Zinkchlorid erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips 622 bei Titration mit Zinkchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und dem Clip 622 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (10-facher Überschuss an Zinkchlorid)

	Clip 622	Zinkchlorid
Einwaage [mg]:	0.17 ($2.73 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.44 ($3.22 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	4.0
Konzentration [mol/L]:	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.07 \cdot 10^{-4}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[622] [mol/L]	[ZnCl ₂] [mol/L]	[ZnCl ₂]/ [622]	I 347 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.73 \cdot 10^{-5}$	0	0	265.8	0.0	0.0
10	710	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.14 \cdot 10^{-5}$	0.42	267.7	1.9	1.4
20	720	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.24 \cdot 10^{-5}$	0.82	265.8	0.0	2.8
30	730	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.32 \cdot 10^{-5}$	1.21	263.1	2.6	4.2
40	740	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.36 \cdot 10^{-5}$	1.60	262.5	3.2	5.5
60	760	$2.37 \cdot 10^{-5}$	$6.37 \cdot 10^{-5}$	2.33	262.2	3.5	8.0
80	780	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.28 \cdot 10^{-5}$	3.03	261.5	4.2	10.4
100	800	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.01 \cdot 10^{-4}$	3.69	260.6	5.1	12.6
120	820	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.18 \cdot 10^{-4}$	4.32	258.3	7.5	14.8
150	850	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.42 \cdot 10^{-4}$	5.21	252.8	12.9	17.8
180	880	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.65 \cdot 10^{-4}$	6.04	248.1	17.7	20.6
220	920	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.93 \cdot 10^{-4}$	7.06	242.6	23.1	24.1
260	960	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.19 \cdot 10^{-4}$	8.00	232.4	33.4	27.3
300	1000	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.42 \cdot 10^{-4}$	8.86	224.6	41.1	30.2

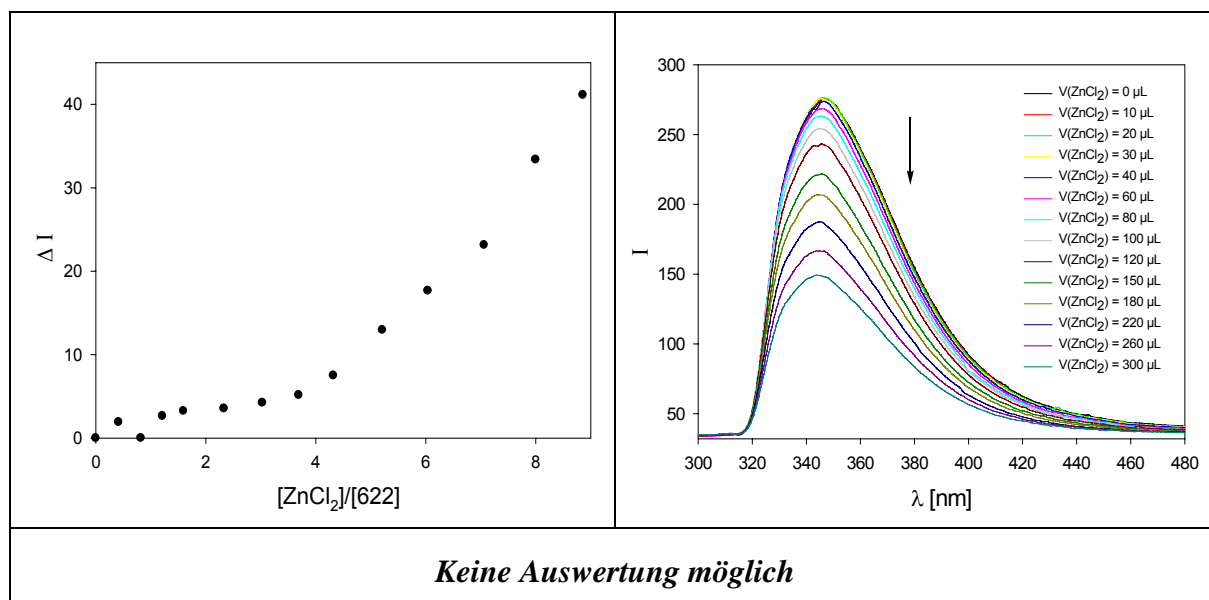


Abbildung 6.29: Fluoreszenztitration zwischen Zinkchlorid und Clip 622 in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 347 nm als Funktion der Äquivalente an Zinkchlorid erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips 622 bei Titration mit Zinkchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Kupfer(II)-sulfat und dem Clip 622 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (40-facher Überschuss an Kupfer(II)-sulfat)

	Clip 622	Kupfer(II)-sulfat
Einwaage [mg]:	0.17 ($2.73 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.525 ($3.29 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	1.0
Konzentration [mol/L]:	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.29 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[622] [mol/L]	[CuSO ₄] [mol/L]	[CuSO ₄]/ [622]	I 347 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.73 \cdot 10^{-5}$	0	0	282.2	0.0	0.0
10	710	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.63 \cdot 10^{-5}$	1.70	257.9	24.2	26.5
20	720	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$9.14 \cdot 10^{-5}$	3.34	233.9	48.3	48.7
30	730	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.35 \cdot 10^{-4}$	4.95	218.2	64.0	67.6
40	740	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.78 \cdot 10^{-4}$	6.51	201.7	80.5	83.8
60	760	$2.37 \cdot 10^{-5}$	$2.60 \cdot 10^{-4}$	9.50	171.0	111.1	110.1
80	780	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.37 \cdot 10^{-4}$	12.34	152.5	129.7	130.6
100	800	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.11 \cdot 10^{-4}$	15.04	133.9	148.2	147.0
120	820	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.81 \cdot 10^{-4}$	17.61	117.0	165.1	160.4
150	850	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$5.80 \cdot 10^{-4}$	21.24	101.9	180.3	176.4
180	880	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.73 \cdot 10^{-4}$	24.62	93.0	189.2	189.0
220	920	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$7.87 \cdot 10^{-4}$	28.78	80.1	202.0	202.1
260	960	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.91 \cdot 10^{-4}$	32.59	71.3	210.8	212.2
300	1000	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$9.87 \cdot 10^{-4}$	36.10	65.2	217.0	220.3

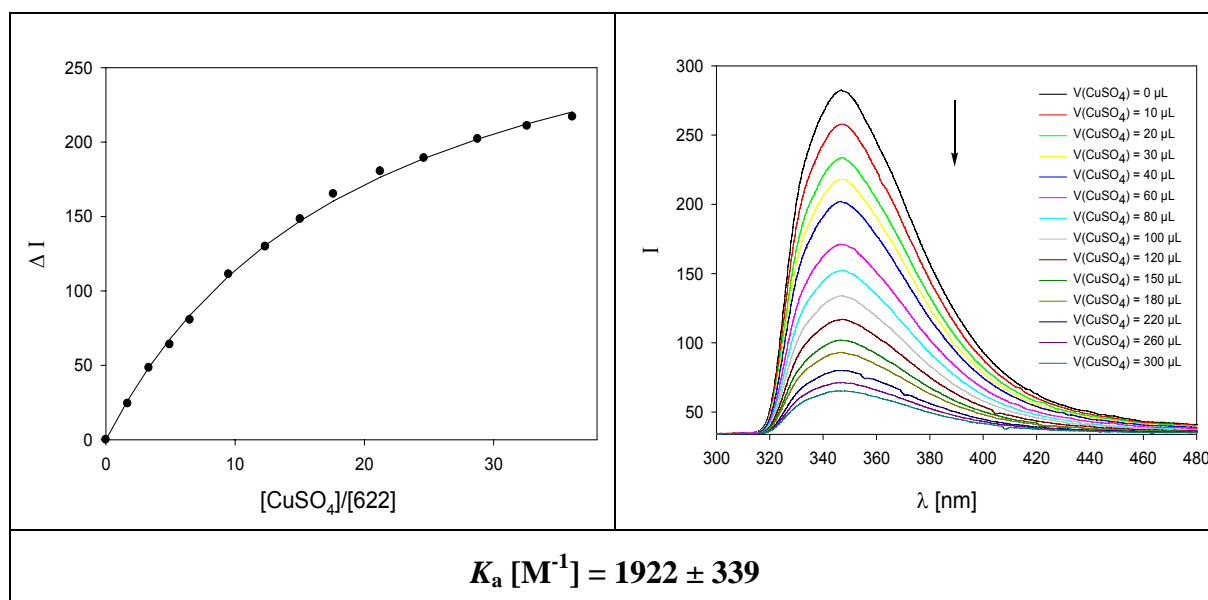


Abbildung 6.30: Fluoreszenztitration zwischen Kupfer(II)-sulfat und Clip **622** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 347 nm als Funktion der Äquivalente an Kupfer(II)-sulfat erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips **622** bei Titration mit Kupfer(II)-sulfat in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Eisen(II)-sulfat und dem Clip **622** in Tris-Puffer (pH = 8.0) (25-facher Überschuss an Eisen(II)-sulfat)

	Clip 622	Eisen(II)-sulfat
Einwaage [mg]:	0.17 ($2.73 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.57 ($2.05 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.9
Konzentration [mol/L]:	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.28 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[622] [mol/L]	[FeSO ₄] [mol/L]	[FeSO ₄]/ [622]	I 347 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.73 \cdot 10^{-5}$	0	0	300.7	0.0	0.0
10	710	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.21 \cdot 10^{-5}$	1.17	256.3	44.3	40.6
20	720	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.33 \cdot 10^{-5}$	2.32	227.7	72.9	72.5
30	730	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$9.36 \cdot 10^{-5}$	3.43	203.7	96.9	98.2
40	740	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.23 \cdot 10^{-4}$	4.51	183.6	118.1	119.2
60	760	$2.37 \cdot 10^{-5}$	$1.80 \cdot 10^{-4}$	6.58	150.9	149.7	151.5
80	780	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.34 \cdot 10^{-4}$	8.55	127.1	173.5	175.1
100	800	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.85 \cdot 10^{-4}$	10.42	107.9	192.8	192.9
120	820	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.33 \cdot 10^{-4}$	12.20	91.7	208.9	206.9
150	850	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.02 \cdot 10^{-4}$	14.71	74.9	225.8	223.0
180	880	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.66 \cdot 10^{-4}$	17.05	62.0	238.7	235.1
220	920	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$5.45 \cdot 10^{-4}$	19.93	52.3	248.4	247.2
260	960	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.17 \cdot 10^{-4}$	22.57	45.8	254.9	256.3
300	1000	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.83 \cdot 10^{-4}$	25.00	41.2	259.5	263.4

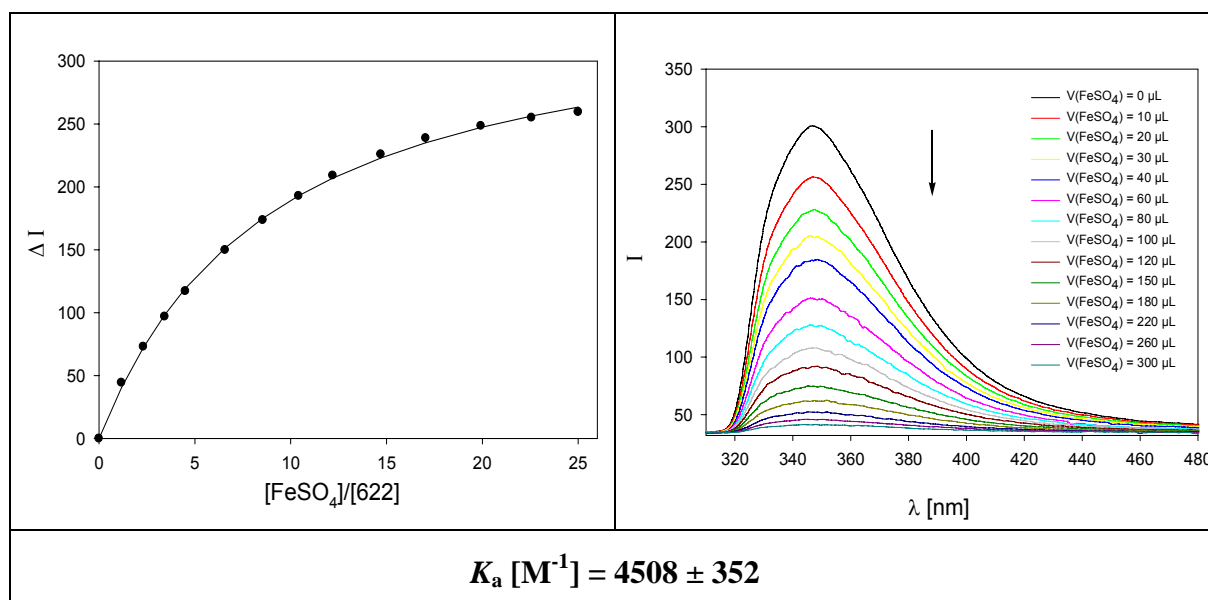


Abbildung 6.31: Fluoreszenztitration zwischen Eisen(II)-sulfat und Clip **622** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 347 nm als Funktion der Äquivalente an Eisen(II)-sulfat erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips **622** bei Titration mit Eisen(II)-sulfat in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Calciumchlorid und dem Clip 622 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (265-facher Überschuss an Calciumchlorid)

	Clip 622	Calciumchlorid
Einwaage [mg]:	0.17 ($2.73 \cdot 10^{-4}$ mmol)	2.30 ($2.07 \cdot 10^{-2}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.7
Konzentration [mol/L]:	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.96 \cdot 10^{-2}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[622] [mol/L]	[CaCl ₂] [mol/L]	[CaCl ₂]/ [622]	I 347 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.73 \cdot 10^{-5}$	0	0	281.3	0.0	0.0
10	710	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.17 \cdot 10^{-4}$	15.3	283.8	2.5	2.3
20	720	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.22 \cdot 10^{-4}$	30.1	284.9	3.6	4.3
30	730	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.22 \cdot 10^{-3}$	44.5	287.0	5.8	6.1
40	740	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.60 \cdot 10^{-3}$	58.6	289.1	7.8	7.6
60	760	$2.37 \cdot 10^{-5}$	$2.34 \cdot 10^{-3}$	85.5	291.2	9.9	10.1
80	780	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.04 \cdot 10^{-3}$	111.1	293.0	11.7	12.1
100	800	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.70 \cdot 10^{-3}$	135.4	294.2	12.9	13.7
120	820	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.33 \cdot 10^{-3}$	158.5	297.7	16.4	15.1
150	850	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$5.22 \cdot 10^{-3}$	191.1	299.7	18.4	16.7
180	880	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.06 \cdot 10^{-3}$	221.6	298.7	17.4	18.0
220	920	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$7.08 \cdot 10^{-3}$	259.0	300.4	19.1	19.4
260	960	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.02 \cdot 10^{-3}$	293.4	300.7	19.4	20.5
300	1000	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.88 \cdot 10^{-3}$	324.9	303.3	22.0	21.4

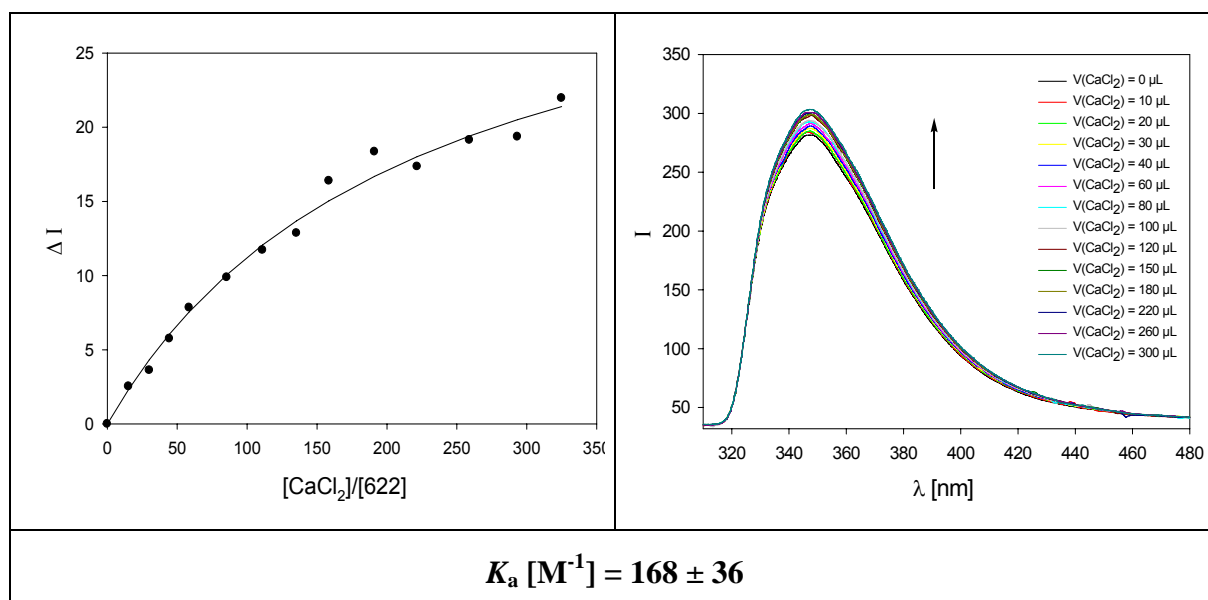


Abbildung 6.32: Fluoreszenztitration zwischen Calciumchlorid und Clip 622 in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 347 nm als Funktion der Äquivalente an Calciumchlorid erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips 622 bei Titration mit Calciumchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Magnesiumchlorid und dem Clip 622 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (265-facher Überschuss an Magnesiumchlorid)

	Clip 622	Magnesiumchlorid
Einwaage [mg]:	0.17 ($2.73 \cdot 10^{-4}$ mmol)	3.43 ($1.69 \cdot 10^{-2}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.7
Konzentration [mol/L]:	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.41 \cdot 10^{-2}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[622] [mol/L]	[MgCl ₂] [mol/L]	[MgCl ₂]/ [622]	I 347 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.73 \cdot 10^{-5}$	0	0	281.7	0.0	0.0
10	710	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.39 \cdot 10^{-4}$	12.42	287.0	5.3	3.8
20	720	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.69 \cdot 10^{-4}$	24.49	290.7	9.0	7.2
30	730	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$9.90 \cdot 10^{-4}$	36.32	291.8	10.1	10.1
40	740	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-3}$	47.67	295.0	13.3	12.8
60	760	$2.37 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-3}$	69.62	298.5	16.8	17.2
80	780	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-3}$	90.44	302.4	20.7	20.9
100	800	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.01 \cdot 10^{-3}$	110.23	305.4	23.7	23.9
120	820	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.53 \cdot 10^{-3}$	129.05	308.0	26.3	26.5
150	850	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.25 \cdot 10^{-3}$	155.61	310.3	28.6	29.7
180	880	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.93 \cdot 10^{-3}$	180.37	312.8	31.1	32.3
220	920	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$5.76 \cdot 10^{-3}$	210.87	318.2	36.5	35.1
260	960	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-3}$	238.83	317.9	36.2	37.3
300	1000	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$7.23 \cdot 10^{-3}$	264.55	322.3	40.6	39.1

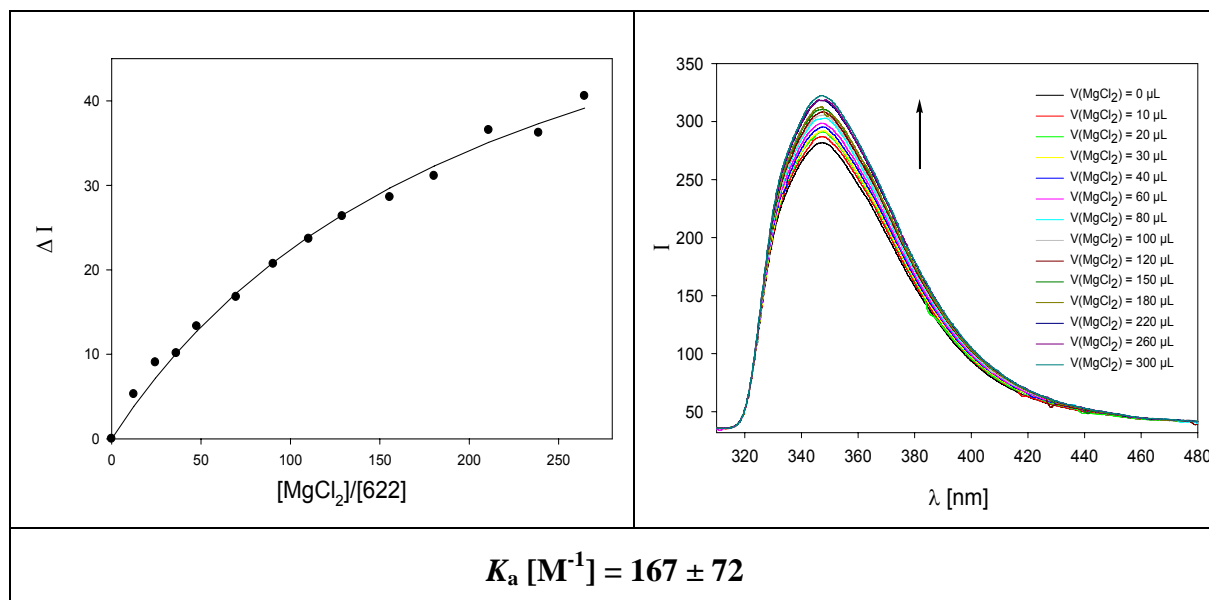


Abbildung 6.33: Fluoreszenztitration zwischen Magnesiumchlorid und Clip 622 in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 347 nm als Funktion der Äquivalente an Magnesiumchlorid erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips 622 bei Titration mit Magnesiumchlorid in Tris-Puffer.

Fluoreszenztitration zwischen Caesiumcarbonat und dem Clip 622 in Tris-Puffer (pH = 8.0) (30-facher Überschuss an Caesiumcarbonat)

	Clip 622	Caesiumcarbonat
Einwaage [mg]:	0.17 ($2.73 \cdot 10^{-4}$ mmol)	2.30 ($2.07 \cdot 10^{-2}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.0	0.7
Konzentration [mol/L]:	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.96 \cdot 10^{-2}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[622] [mol/L]	$[\text{Cs}_2\text{CO}_3]$ [mol/L]	$[\text{Cs}_2\text{CO}_3]/$ [622]	I 347 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.73 \cdot 10^{-5}$	0	0	276.2	0.0	0.0
10	710	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.15 \cdot 10^{-5}$	1.52	275.8	0.4	0.6
20	720	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.18 \cdot 10^{-5}$	2.99	276.6	0.4	1.2
30	730	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.21 \cdot 10^{-4}$	4.43	277.1	0.9	1.8
40	740	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$1.59 \cdot 10^{-4}$	5.83	272.1	4.11	2.3
60	760	$2.37 \cdot 10^{-5}$	$2.33 \cdot 10^{-4}$	8.51	274.5	1.8	3.4
80	780	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.02 \cdot 10^{-4}$	11.06	273.9	2.3	4.4
100	800	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$3.68 \cdot 10^{-4}$	13.48	271.6	4.6	5.3
120	820	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$4.31 \cdot 10^{-4}$	15.78	270.2	6.0	6.2
150	850	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$5.20 \cdot 10^{-4}$	19.02	266.3	9.9	7.5
180	880	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$6.03 \cdot 10^{-4}$	22.05	267.0	9.2	8.7
220	920	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$7.05 \cdot 10^{-4}$	25.78	265.5	10.7	10.1
260	960	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$7.98 \cdot 10^{-4}$	29.20	265.4	10.8	11.4
300	1000	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$8.84 \cdot 10^{-4}$	32.34	263.8	12.4	12.7

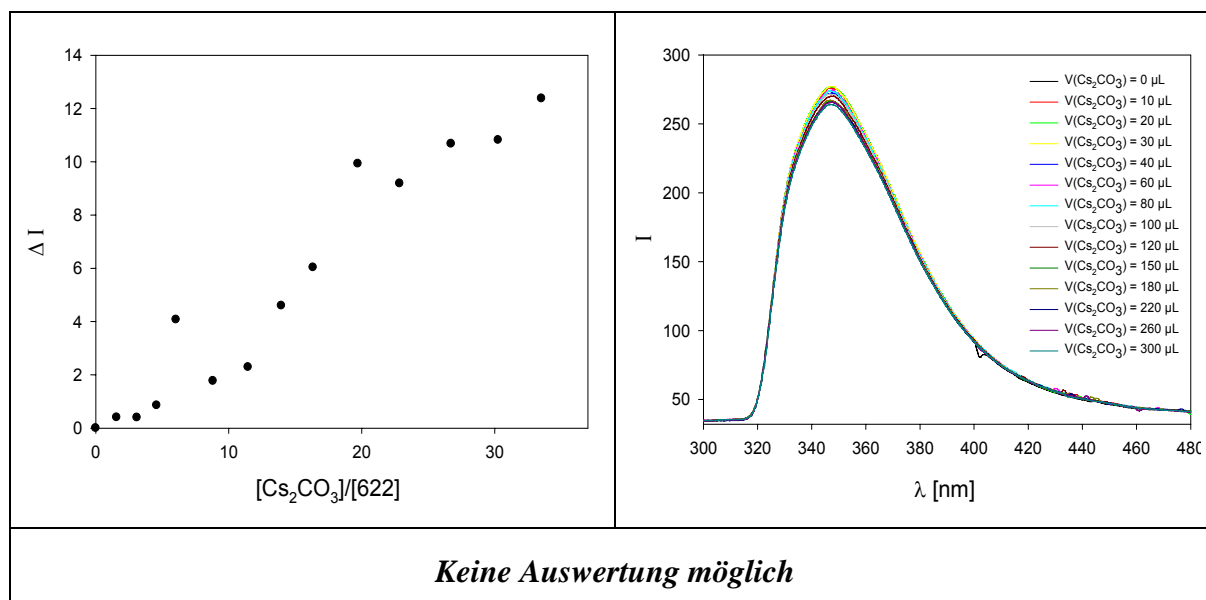


Abbildung 6.34: Fluoreszenztitration zwischen Caesiumcarbonat und Clip **622** in Tris-Puffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 347 nm als Funktion der Äquivalente an Caesiumcarbonat erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips **622** bei Titration mit Caesiumcarbonat in Tris-Puffer.

6.7.3 Überprüfung der Komplexeigenschaften des Tweezers 8 und des Clips 9

Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und dem Bisnatriumsalz des monophosphorylierten Tweezers 8 in Phosphatpuffer (pH = 7.64)

	Tweezer 8	Ac-Lys-OMe · AcOH
Einwaage [mg]:	0.190 ($2.18 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.374 ($1.57 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	9.978	0.65
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[8] [mol/L]	[AcLysOMe] [mol/L]	[AcLysOMe]/ [8]	I 327 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	45.9	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.39 \cdot 10^{-5}$	1.55	46.9	0.9	0.9
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.70 \cdot 10^{-5}$	3.06	47.3	1.4	1.5
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.91 \cdot 10^{-5}$	4.53	47.9	2.0	1.8
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.96	48.2	2.2	2.1
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.71	48.2	2.2	2.4
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	11.31	48.3	2.3	2.5
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.01 \cdot 10^{-4}$	13.79	48.9	2.9	2.7
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.53 \cdot 10^{-4}$	16.14	48.6	2.7	2.7
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.25 \cdot 10^{-4}$	19.46	48.6	2.6	2.8
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.93 \cdot 10^{-4}$	22.56	48.8	2.9	2.9
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.76 \cdot 10^{-4}$	26.37	48.9	3.0	2.9
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-4}$	29.87	49.1	3.1	2.9
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.23 \cdot 10^{-4}$	33.09	49.0	3.1	3.0

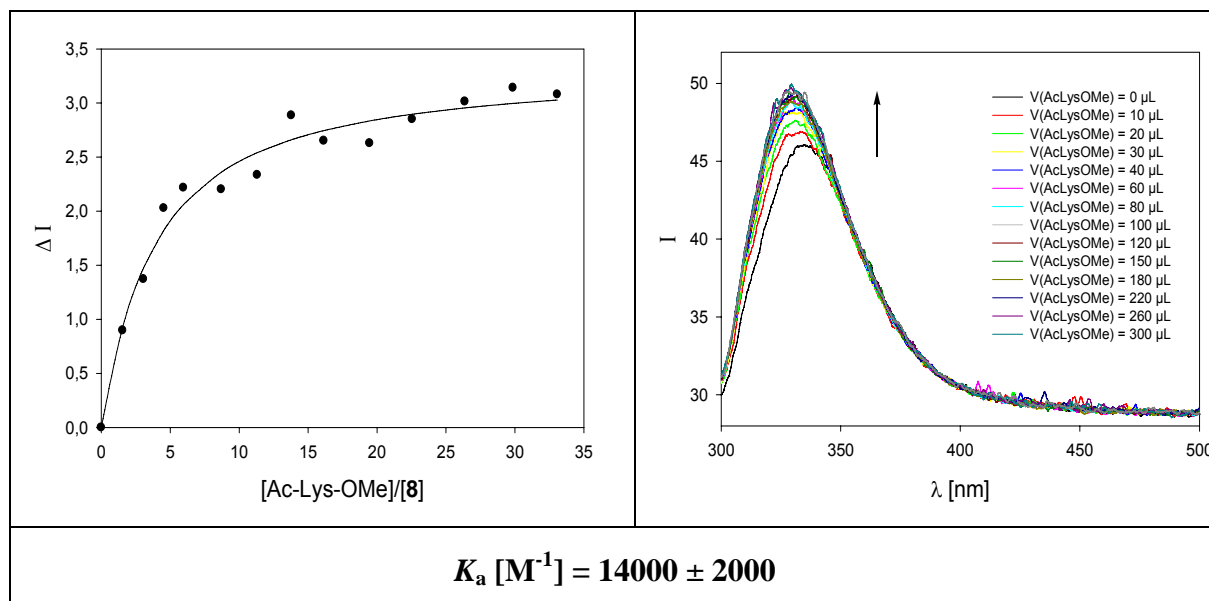


Abbildung 6.35: Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und Tweezer **8** in Phosphatpuffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 327 nm als Funktion der Äquivalente an Ac-Lys-OMe erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **8** bei Titration mit Ac-Lys-OMe in wässrigem Phosphatpuffer bei pH = 7.64.

Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und dem Bisnatriumsalz des monophosphorylierten Tweezers 8 in Methanol

	Tweezer 8	Ac-Lys-OMe · AcOH
Einwaage [mg]:	0.189 ($2.16 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.382 ($1.60 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	9.925	0.664
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[8] [mol/L]	[AcLysOMe] [mol/L]	[Ac-Lys-OMe]/ [8]	I 327 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	79.3	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.39 \cdot 10^{-5}$	1.55	84.3	5.1	5.6
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.69 \cdot 10^{-5}$	3.06	89.0	9.8	10.0
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.90 \cdot 10^{-5}$	4.53	93.3	14.0	13.6
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.96	97.4	18.2	16.5
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.71	99.2	19.9	20.9
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	11.31	102.5	23.2	24.1
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.01 \cdot 10^{-4}$	13.78	106.7	27.4	26.6
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.53 \cdot 10^{-4}$	16.14	107.5	28.2	28.5
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.25 \cdot 10^{-4}$	19.46	108.8	29.5	30.7
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.93 \cdot 10^{-4}$	22.55	133.3	34.0	32.4
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.76 \cdot 10^{-4}$	26.37	112.3	33.1	34.1
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-4}$	29.86	115.4	36.1	35.4
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.23 \cdot 10^{-4}$	33.08	115.6	36.3	36.4

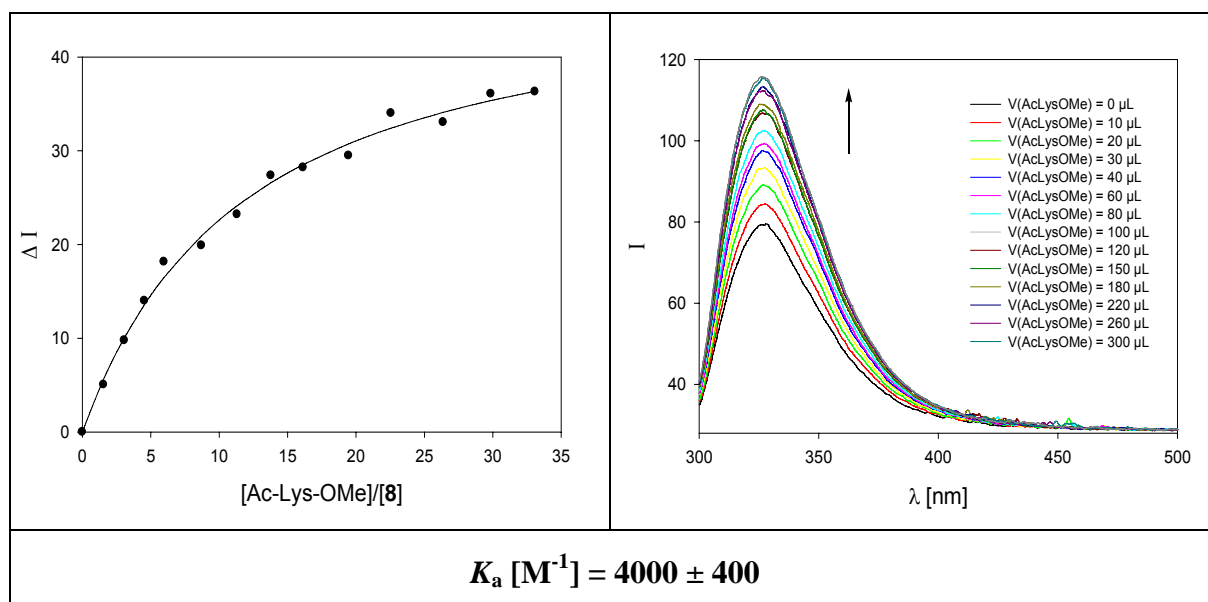


Abbildung 6.36: Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und Tweezer **8** in Methanol. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 327 nm als Funktion der Äquivalente an Ac-Lys-OMe erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **8** bei Titration mit Ac-Lys-OMe in Methanol.

Fluoreszenztitration zwischen NAD^+ und dem Bisnatriumsalz des monophosphorylierten Clips 9 in Phosphatpuffer (pH = 7.64)

	Clip 9	NAD^+
Einwaage [mg]:	0.163 ($2.19 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.648 ($9.77 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.035	0.4
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.40 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[9] [mol/L]	$[\text{NAD}^+]$ [mol/L]	$[\text{NAD}^+]/$ [9]	I 341 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	110.4	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.44 \cdot 10^{-5}$	1.57	91.5	18.9	20.1
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.78 \cdot 10^{-5}$	3.10	81.9	28.4	28.8
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	4.59	77.3	33.1	33.1
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.32 \cdot 10^{-4}$	6.04	73.7	36.7	35.6
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.93 \cdot 10^{-4}$	8.82	71.3	39.1	38.4
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.50 \cdot 10^{-4}$	11.46	69.7	40.7	39.9
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.05 \cdot 10^{-4}$	13.97	68.2	42.1	40.8
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.57 \cdot 10^{-4}$	16.35	68.9	41.5	41.4
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.31 \cdot 10^{-4}$	19.72	68.2	42.2	42.0
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.99 \cdot 10^{-4}$	22.85	68.6	41.8	42.5
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.84 \cdot 10^{-4}$	26.72	68.0	42.4	42.8
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.61 \cdot 10^{-4}$	30.26	67.9	42.4	43.1
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.33 \cdot 10^{-4}$	33.52	68.0	42.4	43.3

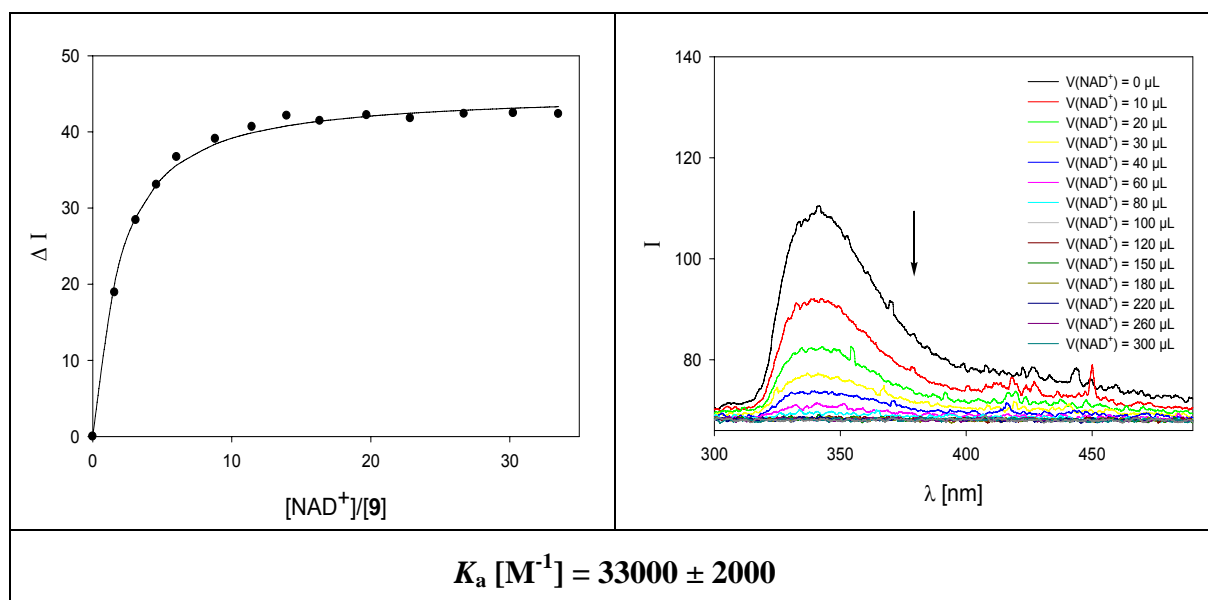


Abbildung 6.37: Fluoreszenztitration zwischen NAD^+ und Clip 9 in Phosphatpuffer. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 341 nm als Funktion der Äquivalente an NAD^+ erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips 9 bei Titration mit NAD^+ in wässrigem Phosphatpuffer bei pH = 7.64.

Fluoreszenztitration zwischen NAD^+ und dem Bisnatriumsalz des monophosphorylierten Clips 9 in Methanol

	Clip 9	NAD^+
Einwaage [mg]:	0.177 ($2.38 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.648 ($9.77 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	10.89	0.4
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.40 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[9] [mol/L]	$[\text{NAD}^+]$ [mol/L]	$[\text{NAD}^+]/$ [9]	I 341 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	176.7	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.44 \cdot 10^{-5}$	1.57	172.7	4.0	21.3
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.78 \cdot 10^{-5}$	3.10	139.2	37.5	36.2
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	4.59	126.9	49.8	47.1
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.32 \cdot 10^{-4}$	6.04	119.6	57.1	55.4
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.93 \cdot 10^{-4}$	8.81	106.9	69.8	67.1
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.50 \cdot 10^{-4}$	11.45	99.3	77.4	74.9
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.05 \cdot 10^{-4}$	13.96	93.9	82.7	80.5
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.57 \cdot 10^{-4}$	16.34	91.5	85.2	84.6
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.31 \cdot 10^{-4}$	19.70	87.1	89.6	89.1
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.99 \cdot 10^{-4}$	22.84	85.5	91.2	92.4
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.84 \cdot 10^{-4}$	26.70	83.9	92.8	95.6
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.61 \cdot 10^{-4}$	30.24	78.5	98.2	97.9
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.33 \cdot 10^{-4}$	33.50	78.8	98.9	99.7

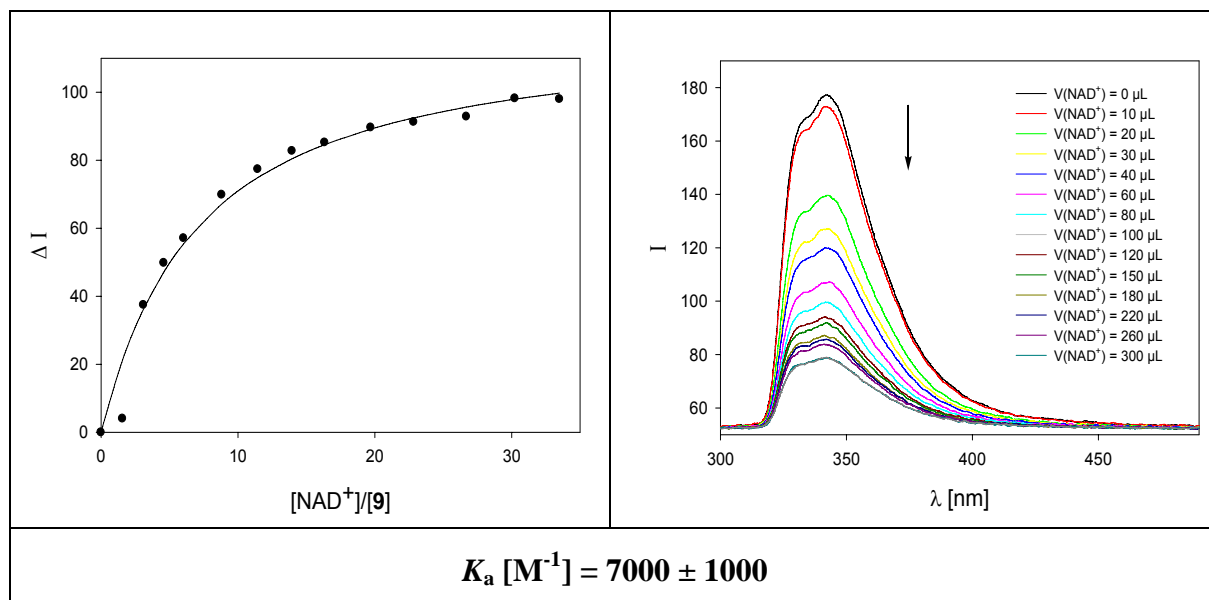


Abbildung 6.38: Fluoreszenztitration zwischen NAD^+ und Clip 9 in Methanol. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 341 nm als Funktion der Äquivalente an NAD^+ erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Clips 9 bei Titration mit NAD^+ in Methanol.

6.7.4 Überprüfung der Komplexeigenschaften des Tweezers 29 und des Clips 30

Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und dem Bisnatriumsalz des monophosphorylierten Tweezers 29 in Methanol

	Tweezer 29	Ac-Lys-OMe · AcOH
Einwaage [mg]:	0.216 ($1.94 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.779 ($3.26 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	8.884	1.354
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$

V _{Gast} [μL]	V _{gesamt} [μL]	[29] [mol/L]	[AcLysOMe] [mol/L]	[Ac-Lys-OMe]/ [29]	I 323 nm	Δ I _{obs}	Δ I _{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	47.6	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.39 \cdot 10^{-5}$	1.55	52.6	5.0	4.6
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.69 \cdot 10^{-5}$	3.06	55.3	7.7	7.5
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.90 \cdot 10^{-5}$	4.53	56.8	9.2	9.5
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.96	58.7	11.1	10.9
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.70	60.3	12.7	12.7
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	11.31	61.4	13.7	13.8
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.01 \cdot 10^{-4}$	13.78	61.9	14.3	14.6
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.53 \cdot 10^{-4}$	16.14	62.7	15.0	15.1
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.25 \cdot 10^{-4}$	19.46	63.1	15.4	15.7
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.93 \cdot 10^{-4}$	22.55	63.6	16.0	16.1
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.76 \cdot 10^{-4}$	26.37	63.8	16.2	16.5
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-4}$	29.86	64.5	16.9	16.7
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.23 \cdot 10^{-4}$	33.08	65.1	17.5	17.0

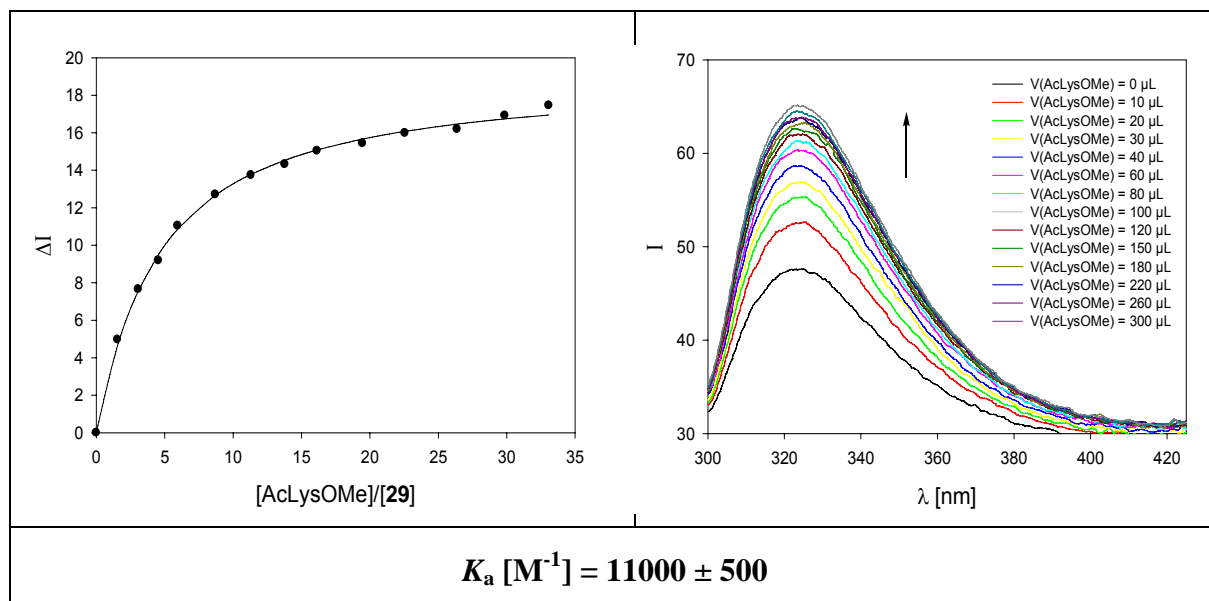


Abbildung 6.40: Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und Tweezer **29** in Methanol. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 323 nm als Funktion der Äquivalente an Ac-Lys-OMe erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **29** bei Titration mit Ac-Lys-OMe in Methanol.

Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und dem Bisnatriumsalz des monophosphorylierten Tweezers 29 in bi-dist.Wasser

	Tweezer 29	Ac-Lys-OMe · AcOH
Einwaage [mg]:	0.201 ($1.81 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.412 ($1.73 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	8.268	0.716
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$

V _{Gast} [μL]	V _{gesamt} [μL]	[29] [mol/L]	[AcLysOMe] [mol/L]	[Ac-Lys-OMe]/ [29]	I 323 nm	Δ I _{obs}	Δ I _{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	246.1	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.40 \cdot 10^{-5}$	1.55	291.0	44.9	49.5
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.70 \cdot 10^{-5}$	3.06	305.7	59.6	56.5
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.91 \cdot 10^{-5}$	4.53	308.2	62.1	58.3
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.96	310.8	64.7	59.1
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.71	309.2	63.1	59.8
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	11.31	309.6	63.5	60.1
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.01 \cdot 10^{-4}$	13.79	306.7	60.6	60.3
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.53 \cdot 10^{-4}$	16.14	306.3	60.3	60.5
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.25 \cdot 10^{-4}$	19.46	305.5	59.4	60.6
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.93 \cdot 10^{-4}$	22.56	303.0	56.9	60.7
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.76 \cdot 10^{-4}$	26.37	303.5	57.4	60.7
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-4}$	29.87	305.7	59.6	60.8
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.23 \cdot 10^{-4}$	33.09	301.5	55.4	60.8

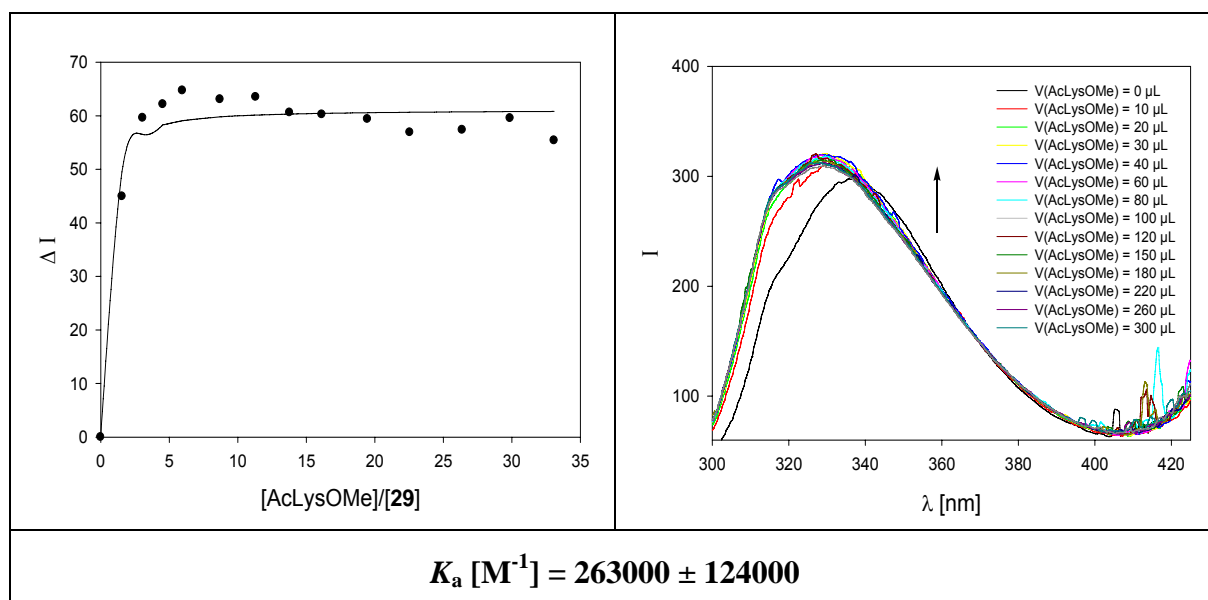


Abbildung 6.41: Fluoreszenztitration zwischen Ac-Lys-OMe und Tweezer **29** in bi-dist. Wasser. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 323 nm als Funktion der Äquivalente an Ac-Lys-OMe erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **29** bei Titration mit Ac-Lys-OMe in bi-dist. Wasser.

Fluoreszenztitration zwischen H-Lys-OH und dem Bisnatriumsalz des monophosphorylierten Tweezers 29 in Methanol

	Tweezer 29	H-Lys-OH · HCl
Einwaage [mg]:	0.216 ($1.94 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.353 ($1.93 \cdot 10^{-3}$ mmol)
Volumen [mL]:	8.884	0.801
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[29] [mol/L]	[HLysOH] [mol/L]	[HLysOH]/ [29]	I 323 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	47.4	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.40 \cdot 10^{-5}$	1.55	45.6	1.8	1.1
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.70 \cdot 10^{-5}$	3.07	45.5	2.0	1.7
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.91 \cdot 10^{-5}$	4.54	45.4	2.1	2.2
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.97	45.0	2.4	2.5
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.71	44.9	2.5	2.9
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	11.32	44.5	2.9	3.1
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.02 \cdot 10^{-4}$	13.79	44.4	3.0	3.3
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.53 \cdot 10^{-4}$	16.15	44.3	3.1	3.4
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.26 \cdot 10^{-4}$	19.47	43.9	3.5	3.5
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.93 \cdot 10^{-4}$	22.57	43.8	3.7	3.6
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.77 \cdot 10^{-4}$	26.39	43.7	3.7	3.7
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-4}$	29.89	43.3	4.2	3.8
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.24 \cdot 10^{-4}$	33.11	43.3	4.1	3.8

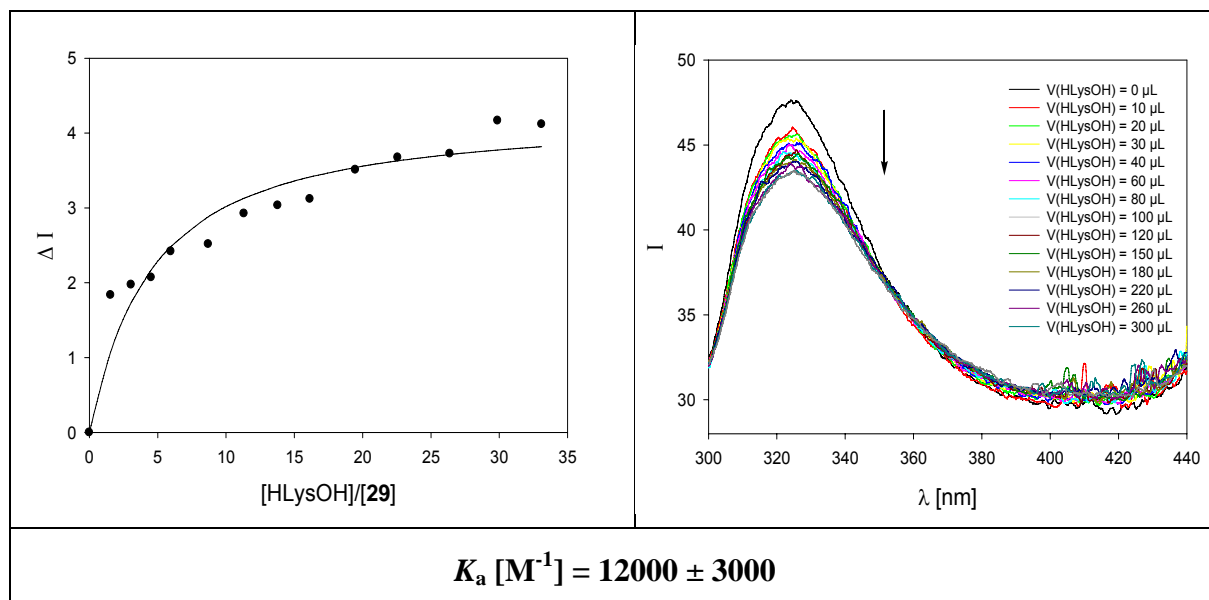


Abbildung 6.42: Fluoreszenztitration zwischen H-Lys-OH und Tweezer **29** in Methanol. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 323 nm als Funktion der Äquivalente an H-Lys-OH erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplekstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **29** bei Titration mit H-Lys-OH in Methanol.

Fluoreszenztitration zwischen H-Lys-OH·HCl und dem Bisnatriumsalz des monophosphorylierten Tweezers 29 in bi-dist. Wasser

	Tweezer 29	H-Lys-OH · HCl
Einwaage [mg]:	0.201 ($1.81 \cdot 10^{-4}$ mmol)	0.320 ($1.75 \cdot 10^{-4}$ mmol)
Volumen [mL]:	8.268	0.727
Konzentration [mol/L]:	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$

V_{Gast} [μL]	V_{gesamt} [μL]	[29] [mol/L]	[HLysOH] [mol/L]	[HLysOH]/ [29]	I 323 nm	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	$2.19 \cdot 10^{-5}$	0	0	293.0	0.0	0.0
10	710	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.40 \cdot 10^{-5}$	1.55	257.2	35.9	35.0
20	720	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.70 \cdot 10^{-5}$	3.07	237.4	55.6	56.0
30	730	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$9.91 \cdot 10^{-5}$	4.54	224.0	69.0	69.6
40	740	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	5.97	213.9	79.1	79.0
60	760	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$1.90 \cdot 10^{-4}$	8.71	202.7	90.3	90.9
80	780	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$2.47 \cdot 10^{-4}$	11.32	194.2	98.8	98.2
100	800	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.02 \cdot 10^{-4}$	13.79	190.4	102.7	103.0
120	820	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$3.53 \cdot 10^{-4}$	16.15	185.5	107.6	106.5
150	850	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.26 \cdot 10^{-4}$	19.47	182.6	110.4	110.1
180	880	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$4.93 \cdot 10^{-4}$	22.57	180.7	112.3	112.6
220	920	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$5.77 \cdot 10^{-4}$	26.39	177.9	115.1	115.0
260	960	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$6.53 \cdot 10^{-4}$	29.89	176.8	116.3	116.7
300	1000	$2.19 \cdot 10^{-5}$	$7.24 \cdot 10^{-4}$	33.11	175.2	117.8	118.0

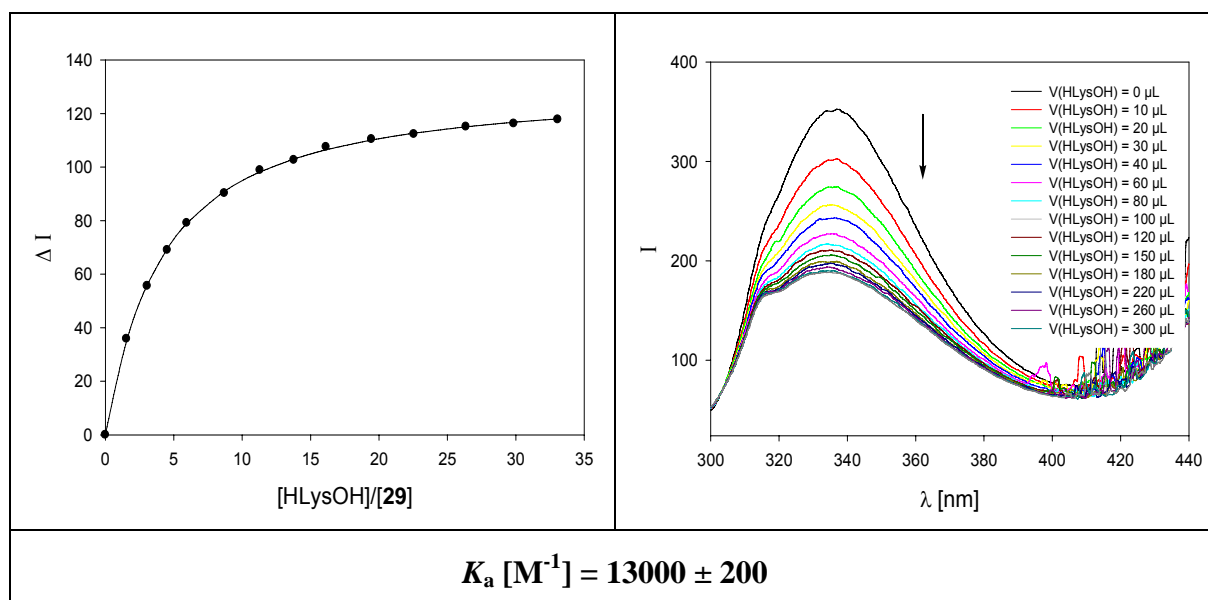


Abbildung 6.43: Fluoreszenztitration zwischen H-Lys-OH und Tweezer **29** in bi-dist. Wasser. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Links: Titrationskurve, die durch Auftragung der Differenz der Emissionsintensität ΔI bei 323 nm als Funktion der Äquivalente an H-Lys-OH erhalten wurde. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Anpassung basierend auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie. Rechts: Änderung der Fluoreszenzspektren einer Lösung des Tweezers **29** bei Titration mit H-Lys-OH in bi-dist. Wasser.

6.8 ^1H -NMR-Verdünnungstitrationen

6.8.1 ^1H -NMR-Verdünnungstitration des Tweezers **8** mit Ac-Lys-OMe

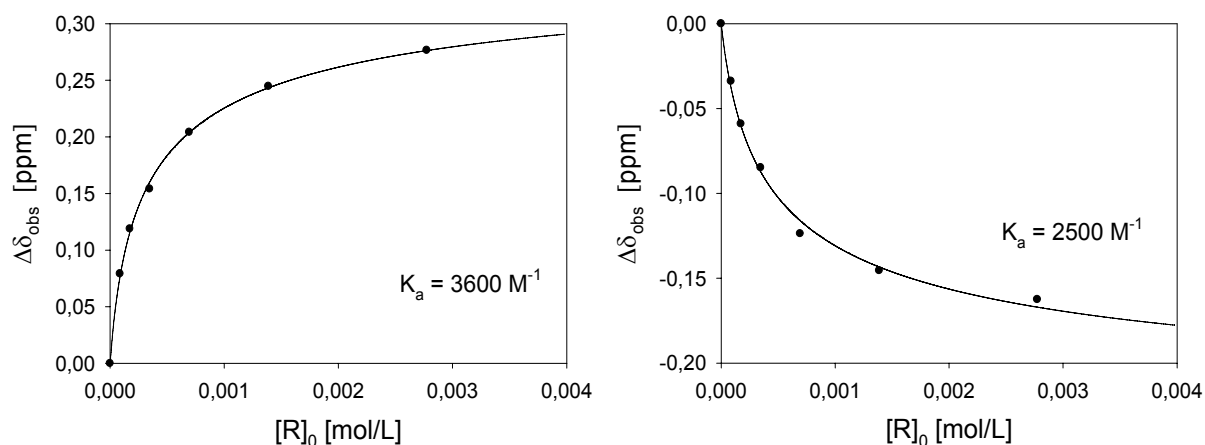


Abbildung 6.44: Abhängigkeit der Komplex-induzierten Verschiebung ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) der ^1H -NMR-Signale der beiden Protonen H-G3 und H-G9 des Lysin-Derivates Ac-Lys-OMe von der Konzentration des Tweezers **8** im Phosphatpuffer bei 298K.

6.8.2 ^1H -NMR-Verdünnungstitration des Clips **9** mit NAD^+

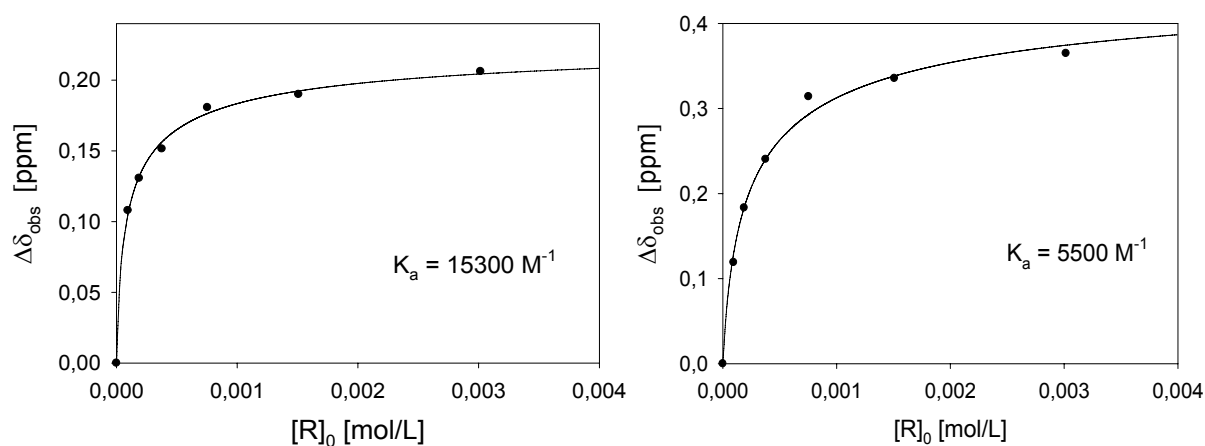


Abbildung 6.45: Abhängigkeit der Komplex-induzierten Verschiebung ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) der ^1H -NMR-Signale der beiden Protonen H-G1 und H-G1A des Cofaktors NAD^+ von der Konzentration des Clip **9** im Phosphatpuffer bei 298K.

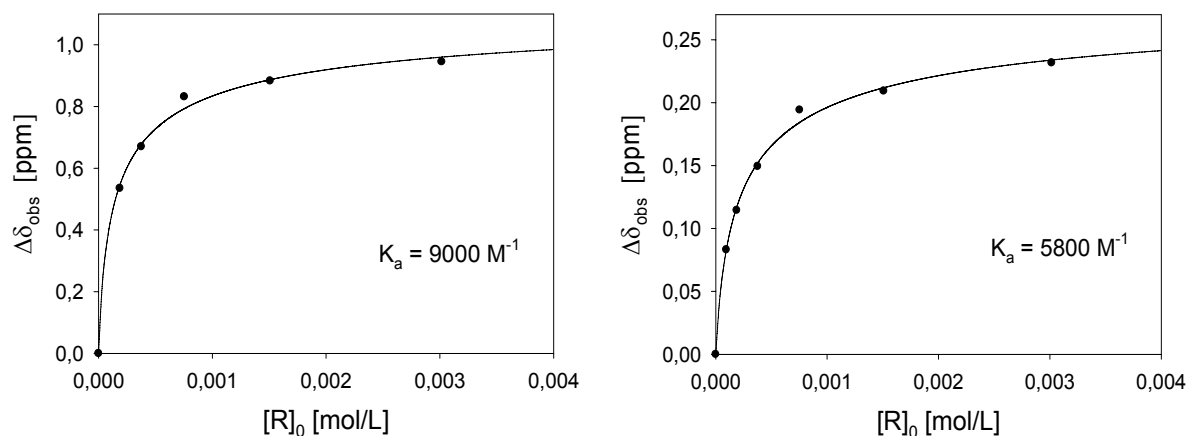


Abbildung 6.46: Abhängigkeit der Komplex-induzierten Verschiebung ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) der ^1H -NMR-Signale der beiden Protonen H-G2 und H-G2A des Cofaktors NAD^+ von der Konzentration des Clip **9** im Phosphatpuffer bei 298K.

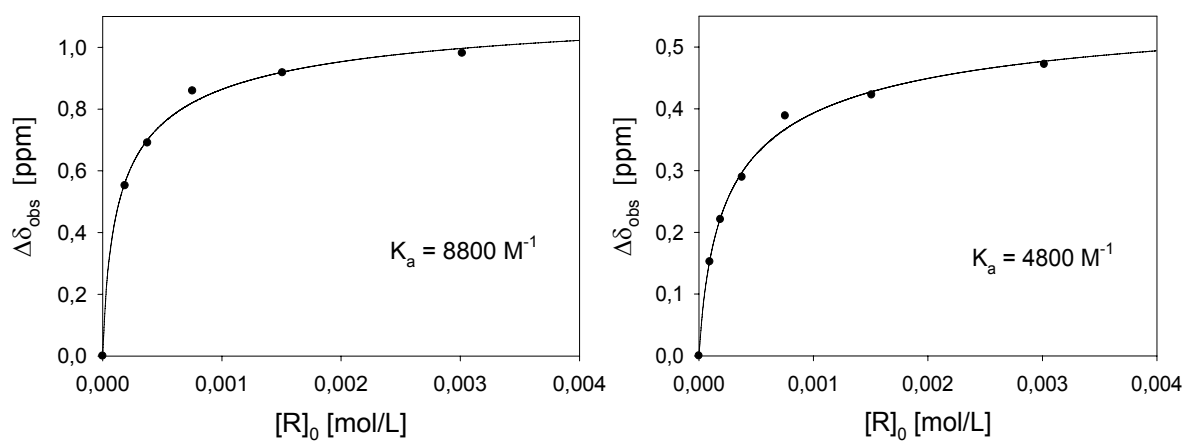


Abbildung 6.47: Abhängigkeit der Komplex-induzierten Verschiebung ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) der ^1H -NMR-Signale der beiden Protonen H-G6 und H-G8A des Cofaktors NAD^+ von der Konzentration des Clip **9** im Phosphatpuffer bei 298K.

6.9 Kristallstrukturdaten

6.9.1 Züchtung von Einkristallen des Clips **5a**

Von dem Clip **5a** konnten mittels Diffusionskristallisation bei einer Temperatur von 4 °C Einkristalle gezüchtet werden. Dazu wurden in einem kleinen Glasgefäß 15 mg des Clips **5a** in 3 mL THF gelöst. Dieses Glasgefäß wurde anschließend in ein größeres Glasgefäß gestellt, dessen Boden mit Diethylether bedeckt war. In Diethylether war Clip **5a** unlöslich. Innerhalb weniger Tage haben sich für die Kristallstrukturanalyse geeignete Kristalle gebildet. Die Röntgenstruktur des monosubstituierten Clips **5a** ist in der Abbildung 6.48 dargestellt.

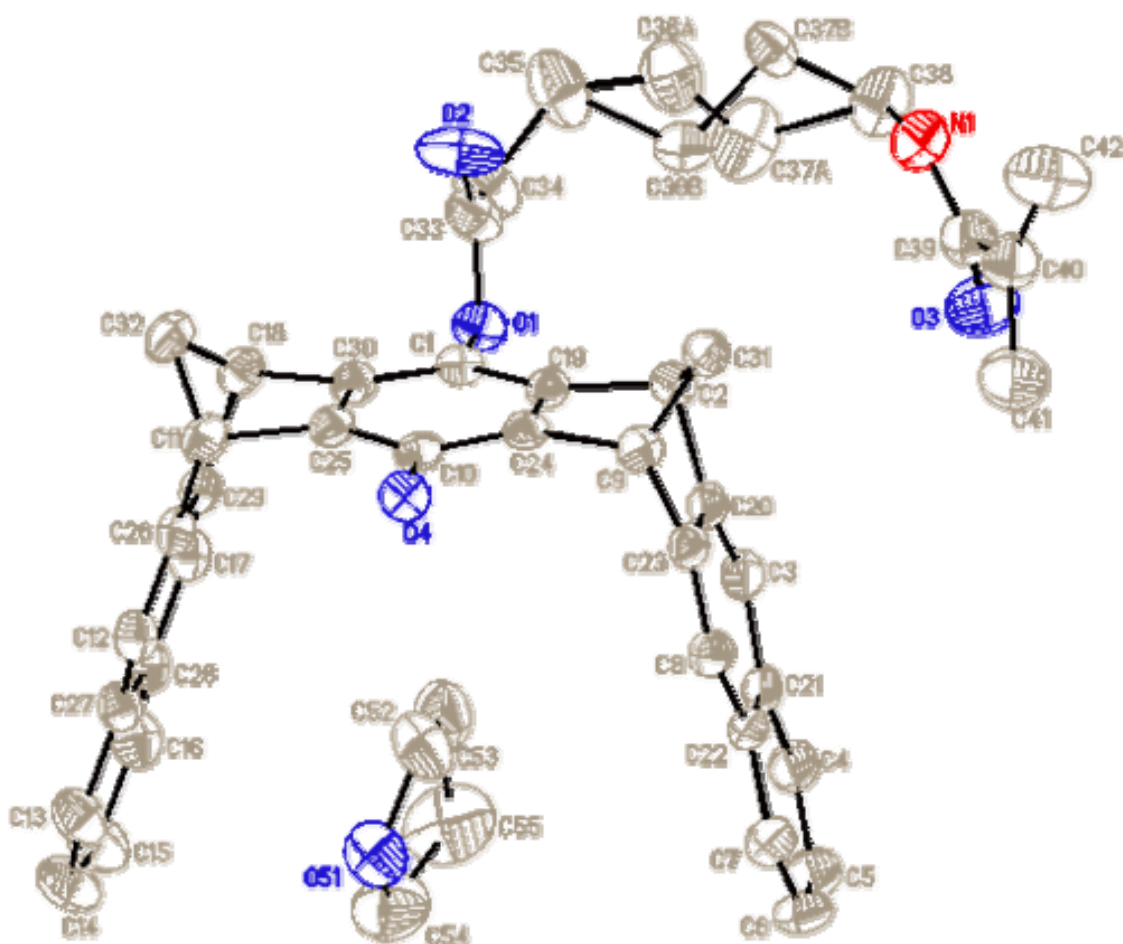


Abbildung 6.48: Röntgenstruktur der bisubstituierten Clip **5b**.

6.9.2 Daten zur Strukturbestimmung des Clips 5a

Identification code	monokla
Empirical formula	$C_{41} H_{37} N O_4 \cdot C_4 H_8 O$
Formula weight	691.83 Da
Density (calculated)	1.194 g cm ⁻³
F(000)	2944
Temperature	296(1) K
Crystal size	0.24 x 0.15 x 0.12 mm
Crystal color	brown
Crystal description	block
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	orthorhombic
Space group	<i>Pbca</i>
Unit cell dimensions	$a = 21.5877(7) \text{ Å}$ $\alpha = 90^\circ$ $b = 10.3924(4) \text{ Å}$ $\beta = 90^\circ$ $c = 34.3079(12) \text{ Å}$ $\gamma = 90^\circ$
Volume	7696.9(5) Å ³
Z	8
Cell measurement reflections used	6433
Cell measurement theta min/max	2.23° to 18.44°
Diffractometer control software	Bruker AXS APEX 2 Vers. 2.0-2 2006
Diffractometer measurement device	Siemens SMART three axis goniometer with APEX II area detector system
Diffractometer measurement method	Data collection strategy APEX 2/COSMO
Theta range for data collection	1.19° to 24.91°
Completeness to theta = 24.91°	98.5 %
Index ranges	-25 ≤ h ≤ 24, -12 ≤ k ≤ 12, -38 ≤ l ≤ 40
Computing data reduction	Bruker AXS APEX 2 Vers. 2.0-2 2006
Absorption coefficient	0.077 mm ⁻¹
Empirical absorption correction	Bruker AXS APEX 2 Vers. 2.0-2 2006
Max. / min. transmission	0.96 / 0.87
R(merge) before/after correction	0.1307 / 0.0445
Computing structure solution	Bruker AXS SHELXTL Vers. 6.12
W95/98/NT/2000/ME	
Computing structure refinement	Bruker AXS SHELXTL Vers. 6.12
W95/98/NT/2000/ME	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Reflections collected	882

Independent reflections	6617 [$R(\text{int}) = 0.0977$]
Data / restraints / parameters	3829 / 0 / 489
Goodness-of-fit on F^2	1.025
Weighting details	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0555 \cdot P)^2 + 4.6968 \cdot P]$ where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0.0650$, $wR2 = 0.1367$
R indices (all data)	$R1 = 0.1239$, $wR2 = 0.1628$
Extinction coefficient	0.00069(14)
Largest diff. peak and hole	0.208 and -0.200 $\text{e}\text{\AA}^{-3}$
Treatment of hydrogen atoms	Riding model on idealized geometries with the 1.2 fold (1.5 fold for methyl and hydroxy groups) isotropic displacement parameters of the equivalent U_{ij} of the corresponding carbon atom
Disorder	Carbon atoms C(36, 37) disordered over two sites with SOF 0.5 together with the riding hydrogen atoms. Riding hydrogen atoms of C(35, 38) disordered over two sites with SOF 0.5

Tabelle 6.1: Fraktionale Atomkoordinaten ($\cdot 10^4$) und äquivalente, anisotrope Versetzungsparameter ($\text{\AA} \cdot 10^3$) für monokla. U(eq) ist als 1/3 der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tenors definiert

	x	y	z	U(eq)
O(1)	4838(1)	692(2)	1955(1)	59(1)
O(2)	4560(2)	2692(3)	2101(1)	114(1)
O(3)	2836(1)	-2178(3)	2927(1)	102(1)
O(4)	4156(1)	1331(2)	392(1)	56(1)
N(1)	2762(1)	-33(3)	2997(1)	77(1)
C(1)	4660(1)	902(3)	1563(1)	47(1)
C(2)	3529(1)	-96(3)	1626(1)	51(1)
C(3)	3664(1)	-2609(3)	1571(1)	55(1)
C(4)	3821(2)	-4927(3)	1434(1)	72(1)
C(5)	3788(2)	-5933(4)	1188(2)	92(1)
C(6)	3566(2)	-5775(4)	811(2)	91(1)
C(7)	3392(2)	-4578(3)	677(1)	79(1)
C(8)	3274(1)	-2235(3)	794(1)	56(1)
C(23)	3329(1)	-1229(3)	1044(1)	50(1)
C(9)	3261(1)	220(3)	994(1)	50(1)
C(10)	4338(1)	1231(3)	772(1)	44(1)
C(11)	5492(1)	2158(3)	712(1)	54(1)
C(12)	6232(1)	350(3)	436(1)	54(1)
C(13)	6946(2)	-1431(4)	255(1)	72(1)
C(14)	7331(2)	-2411(4)	361(1)	84(1)
C(15)	7454(2)	-2639(4)	757(1)	81(1)
C(16)	7198(2)	-1892(3)	1036(1)	68(1)
C(17)	6510(1)	-75(3)	1229(1)	54(1)
C(18)	5746(1)	1857(3)	1349(1)	55(1)
C(20)	3511(1)	-1422(3)	1439(1)	49(1)
C(21)	3636(1)	-3679(3)	1313(1)	58(1)
C(22)	3429(1)	-3497(3)	927(1)	57(1)
C(24)	3922(1)	731(2)	1040(1)	43(1)
C(25)	4914(1)	1603(3)	911(1)	47(1)
C(26)	5969(1)	1073(3)	719(1)	48(1)
C(27)	6657(1)	-646(3)	539(1)	54(1)
C(28)	6791(1)	-870(3)	939(1)	54(1)

C(29)	6118(1)	8(3)	1120(1)	49(1)
C(30)	5074(1)	1434(3)	1304(1)	47(1)
C(19)	4077(1)	558(3)	1431(1)	45(1)
C(31)	2996(1)	552(3)	1399(1)	59(1)
C(32)	5744(2)	2983(3)	1052(1)	65(1)
C(33)	4784(2)	1691(5)	2200(1)	72(1)
C(34)	5046(2)	1385(5)	2596(1)	95(1)
C(35)	4657(2)	1848(6)	2925(1)	113(2)
C(36A)	4027(6)	1541(14)	2998(4)	106(3)
C(37A)	3938(7)	285(13)	3142(5)	113(5)
C(36B)	4112(5)	718(12)	2933(3)	73(3)
C(37B)	3632(4)	1126(10)	3263(2)	68(2)
C(38)	3207(2)	48(4)	3314(1)	94(1)
C(39)	2603(2)	-1144(4)	2830(1)	75(1)
C(40)	2110(2)	-1079(4)	2524(1)	77(1)
C(41)	2141(2)	-2051(4)	2224(1)	107(1)
C(42)	1644(2)	-183(5)	2547(1)	122(2)
O(51)	5200(1)	-2655(3)	150(1)	91(1)
C(52)	5076(2)	-2216(5)	813(1)	105(2)
C(53)	4869(2)	-1882(5)	419(1)	101(1)
C(54)	5494(3)	-3686(4)	353(2)	128(2)
C(55)	5331(3)	-3505(6)	769(2)	152(2)

Tabelle 6.2: Anisotrope Versetzungsparameter ($\text{\AA}^2 \cdot 10^3$) für monokla. Der Exponent des anisotropen Versetzungsfaktors besitzt die Form:

$$-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$$

	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
O(1)	64(1)	67(1)	46(1)	-2(1)	-9(1)	4(1)
O(2)	160(3)	103(2)	79(2)	-32(2)	-16(2)	45(2)
O(3)	120(2)	84(2)	102(2)	-2(2)	-21(2)	15(2)
O(4)	59(1)	64(1)	46(1)	6(1)	-10(1)	4(1)
N(1)	82(2)	77(2)	72(2)	4(2)	-11(2)	-4(2)
C(1)	52(2)	44(2)	44(2)	-4(1)	-5(2)	6(2)
C(2)	50(2)	52(2)	52(2)	-2(2)	2(2)	6(2)
C(3)	48(2)	53(2)	63(2)	7(2)	4(2)	-1(2)
C(4)	73(2)	46(2)	96(3)	9(2)	16(2)	4(2)
C(5)	97(3)	53(2)	127(4)	0(3)	22(3)	6(2)
C(6)	93(3)	49(2)	131(4)	-28(3)	16(3)	1(2)
C(7)	68(2)	65(2)	103(3)	-16(2)	9(2)	-8(2)
C(8)	46(2)	57(2)	65(2)	-5(2)	-2(2)	-4(2)
C(23)	36(2)	49(2)	64(2)	0(2)	-2(1)	-2(1)
C(9)	44(2)	51(2)	55(2)	0(2)	-8(1)	4(1)
C(10)	52(2)	34(2)	45(2)	-1(1)	-8(2)	8(1)
C(11)	57(2)	49(2)	56(2)	7(2)	-6(2)	-3(2)
C(12)	47(2)	63(2)	51(2)	9(2)	-5(2)	-6(2)
C(13)	57(2)	97(3)	63(2)	-3(2)	-2(2)	10(2)
C(14)	65(2)	106(3)	82(3)	-11(2)	-3(2)	30(2)
C(15)	64(2)	92(3)	87(3)	2(2)	-5(2)	28(2)
C(16)	50(2)	80(2)	73(2)	11(2)	-9(2)	10(2)
C(17)	44(2)	68(2)	50(2)	7(2)	-10(2)	-8(2)
C(18)	57(2)	55(2)	54(2)	-4(2)	-9(2)	-8(2)
C(20)	41(2)	49(2)	57(2)	3(2)	4(1)	-1(1)
C(21)	46(2)	51(2)	78(2)	5(2)	13(2)	-5(2)
C(22)	45(2)	45(2)	81(2)	-12(2)	8(2)	-8(2)
C(24)	45(2)	36(2)	49(2)	-4(1)	-6(1)	6(1)
C(25)	50(2)	37(2)	54(2)	0(1)	-3(2)	1(1)
C(26)	40(2)	50(2)	55(2)	6(2)	-4(2)	-9(1)
C(27)	42(2)	64(2)	55(2)	1(2)	-4(2)	-2(2)
C(28)	40(2)	63(2)	59(2)	5(2)	-6(2)	-2(2)
C(29)	40(2)	53(2)	53(2)	-1(2)	-6(1)	-8(2)

C(30)	45(2)	43(2)	53(2)	-5(1)	-5(1)	2(1)
C(19)	45(2)	37(2)	53(2)	-3(1)	-1(1)	4(1)
C(31)	49(2)	54(2)	74(2)	-4(2)	2(2)	4(2)
C(32)	63(2)	54(2)	79(2)	-4(2)	-8(2)	-11(2)
C(33)	62(2)	96(3)	59(2)	-16(2)	-1(2)	10(2)
C(34)	67(2)	166(4)	52(2)	-24(2)	-16(2)	14(3)
C(35)	78(3)	199(5)	63(3)	-8(3)	-1(2)	-8(3)
C(36A)	95(9)	128(11)	96(9)	21(8)	4(6)	3(9)
C(37A)	100(10)	123(11)	117(11)	30(9)	-46(8)	-14(8)
C(36B)	82(7)	65(7)	72(7)	-6(6)	-3(5)	10(6)
C(37B)	55(5)	97(6)	53(5)	-9(5)	2(4)	5(5)
C(38)	102(3)	112(3)	69(3)	11(2)	-19(2)	-24(3)
C(39)	81(3)	79(3)	64(2)	0(2)	0(2)	1(2)
C(40)	80(3)	87(3)	65(2)	-3(2)	-5(2)	-8(2)
C(41)	120(4)	115(4)	85(3)	-17(3)	-1(3)	-4(3)
C(42)	113(4)	141(4)	111(4)	-32(3)	-45(3)	43(3)
O(51)	102(2)	102(2)	69(2)	20(2)	2(2)	8(2)
C(52)	102(3)	130(4)	84(3)	10(3)	11(3)	-22(3)
C(53)	91(3)	120(4)	92(3)	15(3)	24(3)	16(3)
C(54)	155(5)	87(3)	141(5)	18(3)	-5(4)	18(3)
C(55)	238(7)	123(5)	95(4)	47(4)	-31(4)	13(5)

Tabelle 6.3: Wasserstoffatomkoordinaten ($\cdot 10^4$) und äquivalente, anisotrope Versetzungsparameter ($\text{\AA} \cdot 10^3$)

	x	y	z	U(eq)
H(40)	4467	1804	190	85
H(1)	2583	698	2913	92
H(2)	3514	-64	1906	62
H(3)	3791	-2723	1837	66
H(4)	3966	-5057	1695	86
H(5)	3926	-6767	1272	111
H(6)	3525	-6516	646	109
H(7)	3254	-4474	413	94
H(8)	3143	-2095	530	67
H(9)	3036	512	769	60
H(11)	5428	2579	467	65
H(12)	6127	496	168	64
H(13)	68	-1268	-16	87
H(14)	7513	-2954	165	101
H(15)	7721	-3338	829	97
H(16)	7294	-2046	1305	81
H(17)	6601	-206	1500	65
H(18)	5886	2042	1609	66
H(31A)	2972	1462	1444	71
H(31B)	2603	154	1448	71
H(32A)	5465	3659	1126	78
H(32B)	6150	3326	1002	78
H(34A)	5454	1747	2616	114
H(34B)	5082	468	2622	114
H(35A)	4676	2770	2915	136
H(35B)	4876	1600	3157	136
H(35C)	4487	2684	2874	136
H(35D)	4887	1868	3164	136
H(36A)	3800	1637	2759	128
H(36B)	3858	2130	3185	128
H(37A)	4236	121	3344	136

H(37B)	4008	-315	2934	136
H(36C)	4286	-101	3002	88
H(36D)	3908	644	2686	88
H(37C)	3410	1876	3178	82
H(37D)	3846	1321	3501	82
H(38A)	3194	-729	3465	113
H(38B)	3097	751	3482	113
H(38C)	3440	-738	3328	113
H(38D)	2989	150	3556	113
H(41A)	1805	-1928	2045	160
H(41B)	2110	-2889	2341	160
H(41C)	2528	-1981	2087	160
H(42A)	1631	407	2762	146
H(42B)	1330	-148	2349	146
H(52A)	4750	-2168	1003	127
H(52B)	5402	-1637	886	127
H(53A)	4438	-2098	400	122
H(53B)	4916	-982	363	122
H(54A)	5936	-3633	326	153
H(54B)	5356	-4503	256	153
H(55A)	5012	-4108	836	182
H(55B)	5678	-3641	939	182

7 Literaturverzeichnis

1. Lehn, J.-M., *Supramolekulare Chemie Chemische Grundlagenforschung auf neuen Wegen, Wiener Vorlesungen*, Picus Verlag, **2007**.
2. J. M. Lehn, *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**.
3. J. M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 871-892.
4. J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, 2. Ed., Wiley&Sons, **2009**.
5. H.-J. Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley&Sons, **2000**.
6. *Nachrichten aus der Chemie* **2002**, *50*, 302-306.
7. K. Gloe, H. Heßke, L. F. Lindoy, *Wiss. Z. TU Dresden* **2007**, *56*, Heft 1-2.
8. O. Molt, D. Rübeling, G. Schäfer, T. Schrader, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4225-4232.
9. O. Molt, D. Rübeling, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12086-12087.
10. M. Wehner, D. Jannsen, G. Schäfer, T. Schrader, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 138-153.
11. S. Schmatloch, U. S. Schubert, *Chemie in unserer Zeit*, **2003**, *37*, 180-187.
12. D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2001**.
13. G. Löffler, P. E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2003**.
14. V. Pelenc, M. Gerhardt, M. Ringpfeil, *Statusseminar Weiße Biotechnologie in Berlin-Brandenburg*, **2005**.
15. R. Fischer, T. Hirth, *Vom Biokatalysator zum Produkt-industrielle Biotechnologie in der Fraunhofer-Gesellschaft*, **2004**.
16. L. Tidwell, *Weiße Biotechnologie eröffnet neue Wege*, Berliner Zeitung, **2009**.
17. J. R. Vane, *Nat. New Biol.* **1971**, *231*, 232-235.
18. T. Nogrady, D. F. Weaver, *Medicinal Chemistry-A Molecular an Biochemical Approach*; Oxford University Press: New York, **2005**.
19. H.-D. Höltje, W. Sippl, D. Rogan, G. Folkers, Eds.; *Molecular Modeling: Basic Principles And Applications*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2003**.
20. R. E. Babine, S. S. Abdel-Meguid, *Protein Crystallography in Drug Discovery*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2004**.
21. M. Koppitz, K. Eis, *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 561-8.
22. G. Scapin, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2087-97.
23. A. H. Katz, C. E. Caufield, *Curr. Pharm Des.* **2003**, *9*, 857-66.
24. E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210-1250.
25. F.-G. Klärner, B. Kahlert, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 919-932.
26. E. Fischer, *Chem. Ber.* **1984**, *27*, 2985.
27. Y. L. Cho, D. M. Rudkevich, A. Shivanyuk, K. Rissanen, J. Rebek, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3788-3796.
28. M. M. Conn, G. Deslongchamps, J. Demendoza, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3548-3557.
29. G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen Bonding In Biological Structures*, Springer, Berlin, **1991**.
30. G. A. Jeffrey, *An Introduction of Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, New York, **1997**.
31. L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, P. Timmerman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2383-2426.

32. C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc-Perkin Trans 2* **2001**, 651-669.
33. E. Kim, S. Paliwal, C. S. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11192-11193.
34. K. Nakamura, K. N. Houk, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2049-2051.
35. M. O. Sinnokrot, E. F. Valeev, C. D. Sherrill, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10887-10893.
36. J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303-1324.
37. J. Sunner, K. Nishizawa, P. Kebarle, *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 1814-1820.
38. D. J. Cram, M. DiGranpre, C. B. Knobler, K. N. Trueblood, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3286-3292.
39. G. Kryger, I. Silman, J. L. Sussman, *Structure* **1999**, *7*, 297, 307.
40. G. Kryger, I. Silman, J. L. Sussman, *J. Physiol.* **1998**, *92*, 191-194.
41. A. Ohnishi, M. Mihara, H. Kamakura, Y. Tomono, J. Hasegawa, K. Yamazaki, N. Morishita, T. Tanaka, *J. Clin. Pharmacol.* **1993**, *33*, 1086-1091.
42. C. Niu, Y. Xu, Y. Xu, X. Luo, W. Duan, I. Silman, J. L. Sussman, W. Zhu, K. Chen, J. Shen, H. Jiang, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23730-23738.
43. G. Kryger, I. Silman, J. L. Sussman, *Structure* **1999**, *7*.
44. C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2495-2486, 7017-7036.
45. C. J. Pedersen, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1053-1059.
46. C. J. Pedersen, H. K. Frensdorff, *Angew. Chem.* **1972**, *84*, 16-26.
47. J. M. Lehn, *Science* **1985**, *227*, 849-856.
48. R. Breslow, *Isr. J. Chem.* **1979**, *18*, 849-856.
49. F. Diederich, *Cyclophanes*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1991**.
50. S. M. Ngola, P. C. Kearney, S. Mecozzi, K. Russell, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1192-1201.
51. D. Philp, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1155-1196.
52. M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875-1917.
53. F. Venema, C. M. Baselier, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8661-8664.
54. A. Collet, J. P. Dutasta, B. Lozach, J. Canceill, *Top. Curr. Chem.* **1993**, *165*, 103-129.
55. P. D. Kirchhoff, J. P. Dutsta, A. Collet, J. A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 381-390.
56. Z. L. Zhong, A. Ikeda, S. Shinkai, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1085-1087.
57. M. E. Bush, N. D. Bouley, A. R. Urbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14511-14517.
58. M. Herm, O. Molt, T. Schrader, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3245.
59. C.-W. Chen, H. W. Whitlock, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4921-4922.
60. S. C. Zimmerman, *Top. Curr. Chem.* **1993**, *165*, 71-102.
61. S. C. Zimmerman, C. M. VanZyl, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7894-7896.
62. S. C. Zimmerman, C. M. VanZyl, G. S. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1373-1381.
63. A. E. Rowan, J. Elemans, R. J. M. Nolte, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 995-1006.
64. J. Benkhoff, *Dissertation, Universität Duisburg-Essen*, **1994**.
65. F.-G. Klärner, J. Benkhoff, R. Boese, U. Burkert, M. Kamieth, U. Naatz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1130-1133.
66. M. Kamieth, *Dissertation, Universität Duisburg-Essen*, **1998**.
67. F.-G. Klärner, U. Burkert, M. Kamieth, R. Boese, J. Benet-Buchholz, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1700-1707.
68. U. Burkert, *Dissertation, Universität Duisburg-Essen*, **1999**.
69. F.-G. Klärner, J. Panitzky, D. Bläser, D. Preda, L. T. Scott, *J. Mol. Model.* **2000**, *6*, 318-327.

70. M. Kamieth, F.-G. Klärner, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3303-3306.
71. J. Panitzky, *Dissertation, Universität Duisburg-Essen*, **2001**.
72. F.-G. Klärner, J. Panitzky, D. Bläser, R. Boese, *Tetrahedron* **2001**, 57, 3673-3687.
73. F.-G. Klärner, J. Polkowska, J. Panitzky, U. P. Seelbach, U. Burkert, M. Kamieth, R. Boese, *Eur. J. Org.Chem.* **2004**, 1405-1423.
74. F.-G. Klärner, C. Jasper, T. Schrader, J. Panitzky, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1411-1415.
75. M. Fokkens, *Dissertation, Universität Marburg*, **2005**.
76. M. Fokkens, C. Jasper, T. Schrader, F. Koziol, C. Ochsenfeld, J. Polkowska, F.-G. Klärner, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 477-494.
77. C. Jasper, *Dissertation, Universität Marburg*, **2002**.
78. F. Bastkowski, *Diplomarbeit, Universität Duisburg-Essen*, **2004**.
79. F. Bastkowski, *Dissertation, Universität Duisburg-Essen*, **2008**.
80. M. Fokkens, T. Schrader, F.-G. Klärner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14415-14421.
81. T. Schrader, M. Fokkens, F.-G. Klärner, J. Polkowska, F. Bastkowski, *J. Org.Chem.* **2005**, 70, 10227-10237.
82. N. Price, B. Hames, D. Rickwood, *Proteins LabFax Academic Press* **1996**.
83. I. H. Segel, *Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, Wiley-Interscience, **1993**.
84. K. B. Taylor, *Enzyme Kinetics and Mechanisms, Chapter 6: Effects of Analog Inhibitors*, Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, The Netherlands, **2002**.
85. J. T. Hsu, H. C. Wang, G. W. Chen, S. R. Shih, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, 12, 1301-14.
86. W. Lew, X. Chen, C. U. Kim, *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 663-72.
87. J. R. Exequiel, T. Pineda, R. Callender, S. D. Schwartz, *Biophys. J.* **2007**, 93, 1677-1686.
88. *Protein Recognition with Tailored Artificial Receptors contribution to "Cellular and Biomolecular Recognition by Synthetic and non-Biological Molecules"*, R. Jelinek (ed), Wiley-VCH, **2009**.
89. C. G. Whiteley, *Biochem. Educ.* **2000**, 28, 144-147.
90. M. Yoshino, *Biochem. J.* **1987**, 248, 815-820.
91. J. Benkhoff, R. Boese, F.-G. Klärner, *Liebigs Ann.-Recl.* **1997**, 501-516.
92. M. P. Cava, D. R. Napier, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 1701.
93. M. P. Cava, R. L. Shirley, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 654-656.
94. M. N. Paddon-Row, H. K. Patney, K. Harish, *Synthesis* **1986**, 328-330.
95. B. Atasoy, F. Bayramoglu, T. Hökelek, *Tetrahedron* **1994**, 50, 5753-5764.
96. D. N. Butler, R. A. Snow, *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 256-262.
97. V. Leskovac, S. Trivic, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1994**, 32, 399-407.
98. V. Leskovac, *FEMS Yeast Res.* **2002**, 2, 481-494.
99. F. M. Dickinson, G. P. Monger, *Biochem. J.* **1973**, 131, 261-270.
100. W. Schöpp, H. Aurich, *Biochem. J.* **1976**, 157, 15-22.
101. A. J. Ganzhorn, D. W. Green, A. D. Hershey, R. M. Gould, B. V. Plapp, *Biol Chem.* **1987**, 262, 3754-3761.
102. M. Mader, *TU-Darmstadt, Institut für Anorganische Chemie*, **2005**.
103. H. Eklund, *Biochem. Soc. Trans* **1989**, 17, 293.
104. H. Eklund, B. Nordström, E. Zeppezauer, G. Soderlund, I. Ohlsson, T. Boiwe, C. Branden, *FEBS Lett* **1974**, 44, 200.
105. D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1958**, 44, 98-104.
106. H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Grassl, *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. II, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, **1983**.
107. <http://www.worthington-biochem.com/ADH/default.html>.

108. P. Talbiersky, F. Bastkowski, F.-G. Klärner, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9824-9828.
109. *RCSB protein data bank IPS0*.
110. K. Wenck, S. Koch, C. Renner, W. Sun, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16015-16019.
111. H. C. Lo, R. H. Fish, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 478-481.
112. J. Bürck, *Strukturaufklärung von Biomolekülen*, Universität Karlsruhe, **2005**.
113. A. L. Creagh, J. M. Prausnitz, H. W. Blanch, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *41*, 156-161.
114. G. Böhm, *ACGT ProGenomics AG, Halle*, **2005**.
115. S. M. Kelly, N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1338*, 161-185.
116. N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* **1993**, *209*, 32-44.
117. D. M. Tagore, K. I. Sprinz, S. Fletcher, J. Jayawickramarajah, A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 223-225.
118. A. Marschner, S. Schaan, *Agarosegelektrophorese und UV-Quantifizierung, Biochemie*, **2006**.
119. W. A. Eckert, J. Kartenbeck, *Proteine: Standardmethoden der Molekular-und Zellbiologie*, 1ed, Springer, Berlin, **1997**.
120. M. Kotaka, S. Gover, L. Vandeputte-Rutten, S. W. N. Au, V. M. S. Lam, M. J. Adams, *Acta Cryst.* **2005**, *D61*, 495-504.
121. H. R. Levy, *Biochem. Soc. Trans.* **1989**, *17*, 313-315.
122. S. W. N. Au, S. Gover, V. M. S. Lam, M. J. Adams, *Structure* **2000**, *8*, 293-303.
123. M. Kirsch, H. de Groot, *The FASEB Journal* **2001**, *15*, 1569-1574.
124. S. Filosa, A. Fico, F. Paglialunga, M. Balestrieri, A. Crooke, P. Abrescia, J. M. Bautista, G. Martini, *Biochem. J.* **2003**, *370*, 935-943.
125. C. R. Scriver, in: *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. McGraw-Hill, Inc., 7th ed. **1995**, 3367-98.
126. E. Beutler, in: *Hematology*, W. J. Williams, E. Beutler, A. J. Erslev & M. A. Lichtman, eds., McGraw-Hill, New York, **1990**, 591-606.
127. E. A. Zaitseva, E. S. Chukrai, O. M. Poltorak, *Vestnik Moskovskogo Universiteta Khimiya* **2000**, *41*, 127-129.
128. X.-T. Wang, T. F. Chan, V. M. S. Lam, P.C. Engel, *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1403-1411.
129. D. Thomas, H. Cherest, Y. Surdin-Kerjan, *The EMBO Journal*, **1991**, *10*, 547-553.
130. G. Gordon, M. C. Mackow, H. R. Levy, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *318*, 25-29.
131. G. Gordon, J. Miline, N. Loveridge, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *318*, 25-29.
132. G. W. Oertel, I. Rebelein, *Biochem. Biophys. Acta.* **1969**, *184*, 459-460.
133. E. S. Shin, J. Park, J.-M. Shin, D. Cho, S. Y. Cho, D. W. Shin, M. Ham, J. B. Kim, T. R. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3580-3585.
134. C. L. Smith, S. I. Snowdon, *Anaesthesia* **1987**, *42*, 281-288.
135. K. J. Bum, P. Jiyoung, *WIPO Patent Application WO/2006/083051*, **2006**.
136. S. H. Sahin, M. Inal, G. Kaya, A. Alagal&I. Günday, *The Internet Journal of Anesthesiology* **2007**, *14*, 2.
137. M. Kirsch, P. Talbiersky, J. Polkowska, F. Bastkowski, T. Schaller, H. de Groot, F.-G. Klärner, T. Schrader, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *121*, 2930-2934.
138. B. J. Gould, M. A. Goheer, *Biochem. J.* **1976**, *157*, 289-393.
139. M. Cheryan, *Handbuch Ultrafiltration*, B. Behr's Verlag GmbH&Co, **1990**.
140. M. Dixon, E. C. Webb, *Enzymes*, Longman, London, **1979**, pp 343-344.
141. S. Leavitt, E. Freire, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 560-566.
142. G. J. K. Praefcke, C. Herrmann, *BIOspektrum 1/05*, *11. Jahrgang*.
143. M. Kirsch, H. de Groot, *J. Pineal Res.* **2008**, *44*, 244-249.
144. *RCSB protein data bank 2BHL*.
145. *RCSB protein data bank 2BH9*.

146. A. M. Gronenborn, G. M. Clore, L. Hobbs, J. Jeffery, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *145*, 365-371.
147. D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva, G. Poirier, *Biochem. J.* **1999**, *342*, 249-268.
148. M. Y. Kim, T. Zhang, W. L. Kraus, *Genes & Development* **2005**, *19*, 1951-1967.
149. P. Stiegler, *The PARP Link: A Web resource on the PARP protein family and poly(ADP-ribosyl) ation*, **2009**.
150. P. A. Jeggo, *Current Biology*, **1998**, *8*, R49-R51.
151. P. Chambon, J. D. Weil, P. Mandel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *11*, 39-43.
152. P. Chambon, J. D. Doly, M. T. Strosser, P. Mandel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1966**, *25*, 638-643.
153. J.-C. Amé, C. Spenlehauer, G. de Murcia, *BioEssays* **2004**, *26*, 882-893.
154. Z. Herceg, Z.-Q. Wang, *Mutation Research* **2001**, *477*, 97-110.
155. S. Petrucco, R. Percudani, *FEBS Journal* **2008**, *275*, 883-893.
156. O. Mortusewicz, J.-C. Amé, V. Schreiber, H. Leonhardt, *Nucleic Acids Research* **2007**, *1-11*.
157. Z. Tao, P. Gao, D. W. Hoffman, H.-W. Liu, *Biochemistry* **2008**, *47*, 5804-5813.
158. G. Gradwohl, J. M. de Murcia, M. Molinete, F. Simonin, M. Koken, J. H. J. Hoeumakers, G. de Murcia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2990-2994.
159. V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, M. Soto, J. M. Pérez, *Recent Patents on Anit-Cancer Drug Discovery*, **2006**, *1*, 39-53.
160. W.-U. Müller, *Strahlenbiologie* **2004**.
161. M.-F. Langelier, K. M. Servent, E. E. Rogers, J. M. Pascal, *J. Bio. Chem.* **2007**, *1-9*.
162. T. Kinoshita, I. Nakanishi, M. Warizaya, A. Iwashita, Y. Kido, K. Hattori, T. Fujii, *FEBS Letter* **2004**, *556*, 43-36.
163. F. Simonin, O. Poch, M. Delarue, G. de Murcia, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8529-8535.
164. R. Alvarez-Gonzalez, G. Pacheco-Rodriguez, H. Mendoza-Alvarez, *Molecular and Cellular Biochemistry* **1994**, *138*, 33-37.
165. A. Ruf, V. Rolli, G. de Murcia, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 57-65.
166. C. Soldani, A. I. Scovassi, *Apoptosis* **2002**, *7*, 321-328.
167. W. Ying, C. C. Alano, P. Garnier, R. A. Swanson, *Journal of Neuroscience Research* **2005**, *79*, 216-223.
168. A. Chiarugi, M. A. Moskowicz, *Science* **2002**, *297*, 200-201.
169. Q. Huang, H. M. Shen, *Autophagy*. **2009**, *5*, 273-276.
170. L. Virág, C. Szabó, *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 375-429.
171. E. R. Plummer, H. Calvert, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 6252-6256.
172. A. Ruf, G. de Murcia, G. E. Schulz, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3893-3900.
173. A. Ruf, J. M. de Murcia, G. M. de Murcia, G. E. Schuz, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7481-7485.
174. T. Eltze, R. Boer, T. Wagner, S. Einbrenner, M. C. McDonald, C. Thiemermann, A. Bürkle, T. Klein, *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 1587-1598.
175. P. Pacher, C. Szabó, *Cardiovasac Drug. Rev.* **2007**, *25*, 235-260.
176. J. Ishida, H. Yamamoto, Y. Kido, K. Kamijo, K. Murano, H. Miyake, M. Ohkubo, T. Kinoshita, M. Warizaya, A. Iwashita, K. Mihara, N. Matsuoka, K. Hattori, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1378-1390.
177. R. Pellicciari, E. Camaioni, G. Costantino, L. Formentini, P. Sabbatini, F. Venturoni, G. Even, D. Bellocchi, A. Chiarugi, F. Moroni, *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 914-923.
178. E. Perkins, S. Sun, A. Nguyen, S. Tulace, M. Francesco, H. Tavana, H. Nguyen, S. Tugendreich, P. Barthmaier, J. Couto, E. Yeh, S. Theode, K. Jarnagin, A. Jain, D. Morgans, T. Melese, *Cancer Research* **2001**, *61*, 417-4183.

179. A. Iwashita, N. Tojo, S. Matsuura, S. Yamzaki, K. Kamijo, J. Ishida, H. Yamamoto, K. Hattori, N. Matsuoka, S. Mutoh, *JPET* **2004**, 310, 425-436.
180. P. I. Bauer, J. Mendeleyeva, E. Kirsten, J. A. Comstock, A. Hakam, K. G. Buhi, E. Kun, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 63, 445-462.
181. M. Fujita, M. Otsuka, Y. Singuira, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 503-507.
182. W. G. Rice, J. A. Turpin, M. Huang, D. Clantan, R. W. Buckheit Jr., D. G. Covell, A. Wallquist, N. B. McDonnell, R. N. DeGuzman, M. F. Summers, L. Zalkow, J. P. Bader, R. D. Haugwitz, E. A. Sausville, *Nature Medicine* **1997**, 3, 341-345. .
183. *Trevigen Instructions, HT Universal Colorimetric PARP Assay Kit with Histone-Coated Strip Wells, Cat# 4677-096-K.*
184. J. A. Brown, R. B. Marala, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2002**, 47, 137-141.
185. F. Tramontano, M. Malanga, P. Quesada, *Molecular Human Reproduction* **2007**, 13, 821-828.
186. A. Gordon-Shaag, Y. Yosef, M. A. El. Latif, A. Oppenheim, *J. Virol* **2003**, 77, 4273-4282.
187. D. D'Amours, P. J. Duriez, K. Orth, R. G. Shah, V. M. Dixit, W. C. Earnshaw, E. S. Alnemri, G. G. Poirier, *Analytical Biochemistry* **1997**, 249, 106-108.
188. K. S. Putt, P. J. Hergenrother, *Analytical Biochemistry* **2004**, 326, 78-86.
189. C. A. Nottbohm, R. S. Dothager, K. S. Putt, M. T. Hoyt, P. J. Hergenrother, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2112-2115.
190. C. Cosi, K. Guerin, M. Marin, W. Koek, K. Rollet, *Brain Research* **2004**, 996, 1-8.
191. F. D. King, G. Lawton, A. W. Oxford, *Progress in Medicinal Chemistry* **2004**, 42.
192. *RCSB protein data bank 2RCW.*
193. *RCSB protein data bank 2DMJ.*
194. *RCSB protein data bank 2CS2.*
195. F.-G. Klärner, U. Burkert, M. Kamieth, R. Boese, *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, 13, 604-611.
196. J. McLick, A. Hakam, P. I. Bauer, E. Kun, D. E. Zacharias, J. P. Glusker, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 909, 71-83.
197. J. B. Golova, B. K. Chernov, *Solid phase synthesis of 3'-, or 5'- or internal methacrylamido-modified oligodeoxyribonucleotides, US Patent 66791*, **2005**.
198. W. Sun, H. Bandmann, T. Schrader, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 7701-7707.
199. M. Arendt, W. Sun, J. Thomann, X. Xiu, T. Schrader, *Chem. Asian. J.* **2006**, 1, 544-554.
200. Friebolin, *Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, Wiley-VCH, 3. Ed., **1999**, 358.
201. M. Esudey, G. Galindo, M. Briceno, A. C. Chang, *J. Chil. Chem. Soc.*, 49, **2004**.
202. R. P. Haugland, J. E. Whitaker, *Chemically reactive pyrenyloxy sulfonic acid dyes, US Patent 5132432*, **1992**.
203. K. E. Hightower, S. DE, C. Weinbaum, R. A. Spence, P. J. Casey, *Biochem. J.* **2001**, 360, 625-631.
204. M. Schlitzer, *Pharmazie in unserer Zeit*, **1998**, 6, 278-288.
205. GisChem, *Information der BG Chemie*, **2008**.
206. E. Riedel, *Anorganische Chemie*, 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1990**.
207. *Occupational Safety&Environmental Health, Radiation Safety Service, 1239 Kipke Drive 1010 [764-4420]*.
208. T. Schrader, F.-G. Klärner, M. Fokkens, R. Zadnarm, J. Polkowska, F. Bastkowski, C. Jasper, *Neue Wirkstoffe zu Therapie, Diagnostik und Prophylaxe der Makula-Degeneration, Patent DE 10* **2006** 056 822.7.

209. Autorenkollektiv, *Organikum*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, **2001**.
210. M. Kamieth, U. Burkert, P. S. Corbin, S. J. Dell, S. C. Zimmerman, F.-G. Klärner, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2741-2749.
211. H. Friebolin, *Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 2. Auflage ed., VCH, Weinheim, **1992**.
212. SigmaPlot, *SYSTAT Software, Inc.*

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Peter Michael Talbiersky
Geburtsdatum	07/02/1980
Geburtsort	Ludwigsburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Anschrift	Van-Gogh-Strasse 44, 47228 Duisburg

Schul Ausbildung

08 / 1986 - 06 / 1990	Grundschule Pestalozzi, Dorsten
08 / 1990 – 05 / 1999	Gymnasium Petrinum, Dorsten
31 / 05 / 1999	Abschluss Abitur

Wehrdienst

10 / 1999 - 09 / 2000	Grundausbildung in Mayen, danach stationiert in Andernach, Truppenbetreuung bei Radio Andernach
-----------------------	--

Studium

10 / 2000 - 02 / 2003	Grundstudium mit Abschluss Vordiplom
02 / 2003 - 08 / 2005	Hauptstudium Chemie
08 / 2005 - 02 / 2006	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Dr. h. c. R. Sustmann
Thema der Diplomarbeit:	„Synthese von fluoreszierenden NO-Sonden auf der Basis von Pyren als Fluorophor“
02 / 2006	Abschluss Diplom-Chemiker
04 / 2006 - 04 / 2009	Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. T. Schrader
Thema der Doktorarbeit:	„Neue Mechanismen der Enzyminhibition durch molekulare Clips und Tweezers“